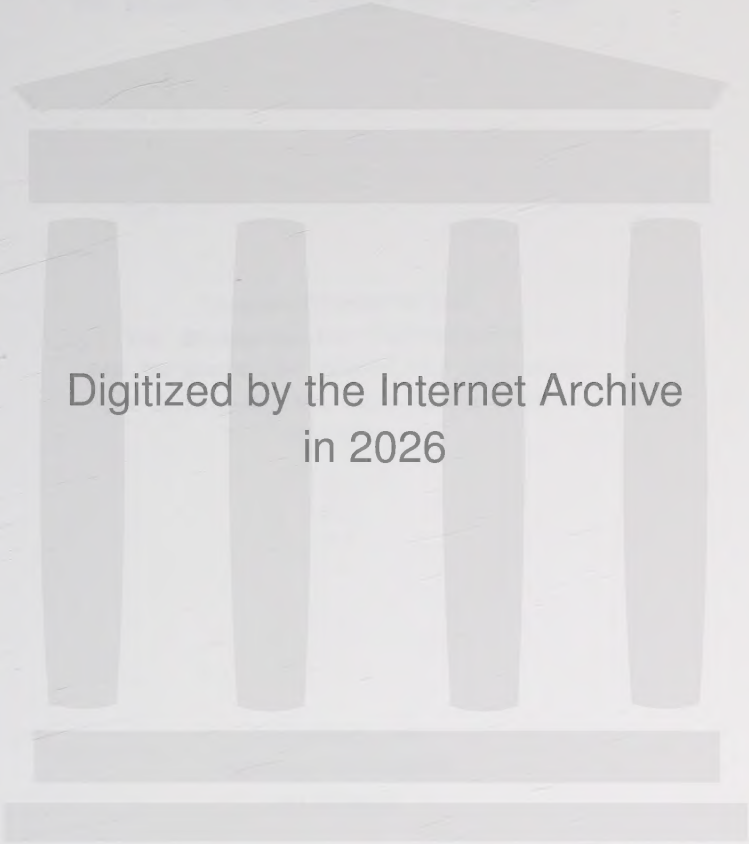


**ABBAU VON REKONSTITUIERTEN
HISTON-DNA-KOMPLEXEN
UND KALBSTHYMUSCHROMATIN
MIT NUKLEASEN**

Michael Steinmetz

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555616_0055

ABBAU VON REKONSTITUIERTEN HISTON-DNA-KOMPLEXEN

UND KALBSTHYMUSCHROMATIN MIT NUKLEASEN

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München



vorgelegt von
Michael Steinmetz
aus Lübeck

München 1977

1. Berichterstatter: Professor Dr. Hans-Georg Zachau
2. Berichterstatter: Professor Dr. Guido Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Februar 1977



Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von April 1973 bis Dezember 1976 ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau danke ich sehr herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und zahlreiche Ratschläge, die zu ihrer Entstehung beigetragen haben. Herrn Dr. R.E. Streeck sowie den anderen Kollegen der Abteilung danke ich für Anregungen und Diskussionen.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

M. Steinmetz, R.E. Streeck und H.G. Zachau, Nature **258**, 447 - 450 (1975)

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Ergebnisse	6
2.1. Spaltung von Histon-DNA-Komplexen mit Restriktionsnukleasen	6
2.1.1. Vorversuche mit PM2-DNA	7
2.1.1.1. Präparation linearer PM2-DNA mit Hilfe von Restriktionsnukleasen aus <i>H. influenzae</i>	7
2.1.1.2. Darstellung und Charakterisierung von Komplexen aus PM2-DNA und Histon H1 ..	9
2.1.1.3. Spaltung von H1-PM2-DNA-Komplexen mit Restriktionsnuklease Hind III	13
2.1.1.4. Zusammenfassung und Wertung der Vorversuche	14
2.1.2. Hind II-Spaltung von Komplexen aus linearer λ dv 21-DNA und einzelnen Histonen ...	15
2.1.3. Hind II-Spaltung von Komplexen aus linearer λ dv 21-DNA und (H3) ₂ (H4) ₂ -Tetramer ..	22
2.1.4. Hind II-Spaltung von Komplexen aus linearer λ dv 21-DNA und Histonmischungen	24
2.1.5. Einfluß der Rekonstitutionsbedingungen auf die Hind II-Spaltung	28
2.2. Charakterisierung von Histon-DNA-Komplexen mit Hilfe unspezifischer Nukleasen	32
2.2.1. Abbau von rekonstituierten Histon-DNA-Komplexen und Zellkernen mit Mikrokokkus-Nuklease und DNAase I	33
2.2.2. Abbau von H1-freiem Chromatin mit Mikrokokkus-Nuklease und DNAase I	46
2.2.3. Einfluß von H1' auf den Abbau rekonstituierter Komplexe	51

2.2.4. Abbau mit DNAase II	59
3. Diskussion	65
3.1. Rekonstitution von Nukleosomenkernen	65
3.2. Präferentielle Bindung von Histonen an be- stimmte DNA-Sequenzen	68
3.3. Überführung von Nukleosomen in Nukleosomen- kerne	70
3.4. Bindet H1 an Nukleosomenkerne?	73
3.5. Einfluß von H1 auf die Zugänglichkeit von... internukleosomalen Spaltstellen	75
4. Materialien und Methoden	78
4.1. Desoxyribonukleinsäuren	78
4.1.1. Präparation linearer PM2-DNA	78
4.1.2. Präparation von λ dv-DNA	79
4.1.3. Präparation von T7-DNA	80
4.1.4. Kalbsthymus-DNA	80
4.1.5. Konzentrationsbestimmung	80
4.2. Kalbsthymushistonfraktionen	80
4.2.1. Säureextrahierte Histone	81
4.2.2. Salzextrahierte Histone	81
4.2.3. Konzentrationsbestimmung	82
4.3. Präparation von Kalbsthymuszellkernen und Chromatin	82
4.3.1. Kalbsthymuszellkerne	82
4.3.2. Kalbsthymuschromatin	83
4.3.3. H1-freies Kalbsthymuschromatin	84
4.4. Rekonstitution der Histon-DNA-Komplexe	84
4.4.1. Kontinuierlicher Salz-Harnstoff-Gradient .	84
4.4.2. Diskontinuierlicher Salz-Harnstoff- Gradient	85
4.4.3. Diskontinuierlicher Salz-Gradient, 4 °C ..	85
4.4.4. Diskontinuierlicher Salz-Gradient, 37 °C .	85
4.4.5. Chromatin mit reassoziertem H1	86

4.4.6. Chromatin mit rekonstituiertem H1	86
4.5. Abbau mit Nukleasen	86
4.6. Gelelektrophorese	87
4.6.1. Agarose-Gelelektrophorese	87
4.6.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	88
4.7. Quantifizierung des Schutzes von Hind II- Spaltstellen auf der λ dv 21-DNA	88
4.8. Kettenlängenbestimmung der DNA-Fragmente	89
4.9. Isolierung rekonstituierter Nukleosomenkerne .	90
4.10. Bestimmung der Sedimentationskonstanten rekonstituierter Nukleosomenkerne	90
5. Zusammenfassung	91
6. Literaturverzeichnis	95
7. Abkürzungsverzeichnis	101

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Säugetierzellen besitzen einen hohen Gehalt an Desoxyribonukleinsäure (DNA). Die DNA, die im haploiden Chromosomensatz enthalten ist, würde auseinandergezogen einen Faden von ungefähr 1 m Länge ergeben. Der Zellkern jedoch, in dem die DNA während der Interphase lokalisiert ist, hat nur einen Durchmesser von etwa 10^{-3} cm. Demnach muß die Zelle über molekulare Mechanismen verfügen, die ihr gestatten, die lange, negativ geladene DNA im Zellkern einzuschließen.

Für die Kondensation der DNA werden die Proteine verantwortlich gemacht, die im Zellkern mit ihr assoziiert sind. Diesen Komplex aus DNA und Proteinen bezeichnet man als Chromatin. Die Proteine im Chromatin lassen sich in zwei Gruppen einteilen, die Histone, eine relativ einheitliche Gruppe sehr basischer Proteine, und die Nichthistonproteine, eine sehr komplexe Gruppe saurer Proteine (Übersicht Ref. 1).

Es gibt fünf Typen von Histonen, die man heute nach der sog. CIBA-Symposium-Nomenklatur (2) als H1, H2A, H2B, H3 und H4 bezeichnet (Tab. 1). Im Unterschied zu den Nichthistonproteinen, deren Gehalt und Zusammensetzung je nach Aktivität der Zelle schwankt, beträgt das Histon/DNA-Gewichtsverhältnis höherer Zellen relativ konstant 1,0. Weiterhin liegen die vier kleinen Histone H2A, H2B, H3 und H4 in etwa äquimolaren Mengen vor, so daß der Zellkern pro 100 Nukleotidpaare (Np) DNA etwa ein Molekül von jedem der vier Histone enthält. Ob das Histon H1, das etwa doppelt so groß ist wie die anderen Histone, ebenfalls in äquimolarer Menge vorhanden ist, ist bisher nicht vollständig geklärt (3).

Fraktion	alte Nomenklaturen	Klasse	Molekular- gewicht	Amino- säure- reste
H1	I, f1, KAP	sehr lysinreich	ca. 21.500	ca. 215
H2A	IIb1, f2a2, ALG	lysin- und argininreich	14.004	129
H2B	IIb2, f2b, KSA	mäßig lysinreich	13.774	125
H3	III, f3, ARE	argininreich	15.324	135
H4	IV, f2a1, GRK	glycin- und argininreich	11.282	102

Tab. 1 Kalbsthymushistone

Daten aus Ref. 1

Die vier kleinen Histone unterscheiden sich in mehrerer Hinsicht vom Histon H1. So hat man gefunden, daß zwischen den vier Histonen starke Wechselwirkungen auftreten, und zwar in den Komplexen aus H3 und H4, aus H2A und H2B und aus H2B und H4 (4), während H1 keine Komplexe mit anderen Histonen bildet. Insbesondere die beiden argininreichen Histone H3 und H4 haben großes Interesse gefunden, weil sie zu einem Tetramerkomplex $(H3)_2(H4)_2$ assoziieren können (4,5), der sich unter schonenden Bedingungen auch direkt aus Chromatin isolieren läßt. Unter den gleichen Bedingungen findet man (H2A, H2B)-Oligomere, während H1 als monomeres Molekül isoliert wird (6).

Aufgrund dieser und anderer Befunde wurde 1974 postuliert, daß Chromatin aus Untereinheiten aufgebaut ist, die sich aus je zwei Molekülen der vier Histone H2A, H2B, H3, H4 und 200 Np DNA zusammensetzen (7). Ein Chromatinfaden besteht aus vielen solcher Untereinheiten, die durch die DNA zu einer flexiblen Kette verbunden sind (7). Ein ähnliches Chromatinmodell wurde auch von anderer Seite vorgeschlagen (8).

Die Untereinheitenstruktur des Chromatins ist inzwischen durch viele experimentelle Befunde gut abgesichert worden, die im wesentlichen aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen, Röntgen- und Neutronenbeugungsexperimenten sowie aus Nukleasebehandlungen von Zellkernen und isoliertem Chromatin stammen (Übersichten Ref. 1, 9 - 12). Bereits vor der Publikation des erwähnten Modells wurden elektronenmikroskopisch lineare Anordnungen diskreter Partikel in schonend präpariertem Chromatin beobachtet (13, 14). Diese Partikel, die als "γ-bodies" bezeichnet wurden (14), hatten einen Durchmesser von ca. 100 Å bzw. ca. 70 Å (13 bzw. 14). Inzwischen sind zahlreiche elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt worden, die alle die partikuläre Struktur des Chromatins bestätigen. Als Name für die Untereinheit hat sich die Bezeichnung Nukleosom (15) weitgehend durchgesetzt.

Jüngste Untersuchungen haben darüber hinaus ergeben, daß der DNA-Gehalt der Nukleosomen zwischen verschiedenen Eukaryonten variiert. Diesen unterschiedlichen Nukleosomen ist jedoch ein sog. Nukleosomenkern gemeinsam, der einheitlich 140 Np DNA enthält (16).

In Übereinstimmung mit dem erwähnten Chromatinmodell führt die Behandlung von Rattenleberzellkernen bzw. Chromatin mit unspezifischen Nukleasen, insbesondere

Mikrokokkus-Nuklease, unter milden Bedingungen zu einer Serie von DNA-Fragmenten, deren Kettenlängen ganzzahlige Vielfache einer Einheitslänge von ca. 200 Np sind (7, 17 - 20). Elektronenmikroskopische Untersuchungen solcher partiell gespaltener Chromatinpräparationen zeigen, daß die Untereinheiten, die durch Abbau mit Nukleasen erhalten werden, identisch sind mit den Untereinheiten, die man im Elektronenmikroskop beobachtet (21, 22).

Die DNA ist in den Untereinheiten wahrscheinlich um den Histonkomplex außen herumgewickelt (23) oder geknickt (24) und wird hierdurch in ihrer Längenausdehnung um den Faktor 6 bis 7 verkürzt (25). Eine weitere Kondensation der DNA im Interphasechromatin und vor allem in den Metaphasechromosomen, die ebenfalls aus Nukleosomen aufgebaut sind (26, 27), könnte durch Überstrukturen erreicht werden, die möglicherweise durch andere Proteine stabilisiert werden. Allgemein wird angenommen, daß das Histon H1, das in dem Chromatinmodell nicht am Aufbau der Untereinheiten beteiligt ist, eine solche Funktion besitzt (Übersicht Ref. 28). Es wurde beispielsweise vorgeschlagen, daß die Phosphorylierung von H1 in der späten G2-Phase des Zellzyklus die Chromosomenkondensation bewirkt und damit die Mitose einleitet (29).

Möglicherweise hat auch die zellzyklusabhängige Modifizierung der übrigen Histone (30) einen Einfluß auf die Struktur und damit die Transkription des Chromatins. Die Histone gehören allgemein zu den am stärksten modifizierbaren Proteinen, was in einem interessanten Gegensatz zu der evolutionären Stabilität ihrer Aminosäuresequenzen steht. Die postsynthetischen Modifizierungen der Histone, im wesentlichen Phosphorylierungen, Methylierungen und Acetylierungen von Aminosäureresten, verändern die Ia-

dungsdichte in den basischen Segmenten und modulieren dadurch die Wechselwirkungen der Histone mit der DNA.

Mindestens 85 % der DNA im Rattenleberzellkern sind mit Nukleosomen besetzt (18). Es ist demnach unwahrscheinlich, daß der Histonkomplex im Nukleosom eine Spezifität für bestimmte DNA-Sequenzen besitzt. Andererseits wurde jedoch überzeugend nachgewiesen, daß Histone und Polypeptide, wie Polylysin und Polyarginin, bestimmte DNA-Sequenzen präferentiell binden können, und zwar lysinreiche Histone bevorzugt AT-reiche Sequenzen, argininreiche Histone dagegen GC-reiche Sequenzen (31 - 33). Da die Komplexierung der DNA mit Histonen deren Zugänglichkeit für RNA-Polymerase und somit die Transkription der DNA vermindert (34), könnte eine Spezifität in der Histon-DNA-Wechselwirkung zur Repression spezifischer Gene führen. Anhand von Histon-DNA-Komplexen, die aus DNA und Histonen rekonstituiert werden sollen, soll in der vorliegenden Arbeit die Frage untersucht werden, ob Histone bestimmte DNA-Sequenzen spezifisch binden können. Rekonstituierte Komplexe wurden bisher vorwiegend mit physikalischen Methoden, wie Ultrazentrifugation, Röntgenkleinwinkelstreuung und Elektronenmikroskopie, untersucht. Das Schwergewicht dieser Arbeit soll dagegen auf der Charakterisierung der Komplexe mit biochemischen Methoden liegen, insbesondere dem Abbau der Komplexe durch Nukleasen. Mit Hilfe dieser Methoden soll weiterhin die Frage beantwortet werden, ob sich durch Rekonstitution der DNA mit einem Gemisch der vier Histone H2A, H2B, H3 und H4 Untereinheiten erhalten lassen, die den Nukleosomen im Chromatin entsprechen. In diesem Zusammenhang soll der Einfluß von H1 auf die Struktur des Chromatins in rekonstituierten und "nativen" Histon-DNA-Komplexen untersucht werden.

2. ERGEBNISSE

2.1. Spaltung von Histon-DNA-Komplexen mit Restriktionsnukleasen

Um die Frage nach einer präferentiellen Bindung der Histone an bestimmte DNA-Sequenzen zu untersuchen, wurde der folgende, einfache Test gewählt: Zunächst wurden Komplexe aus DNA und Histonen rekonstituiert und anschließend mit Restriktionsnukleasen abgebaut, die die DNA spezifisch in einer Erkennungssequenz von 4 - 6 Np spalten (Übersicht Restriktionsnukleasen Ref. 35). Da die Histone die DNA im Komplex vor Nukleaseangriff schützen, soll sich eine spezifische Bindung der Histone an bestimmte DNA-Sequenzen durch einen bevorzugten Schutz bestimmter Spaltstellen bemerkbar machen, der sich über eine Analyse des DNA-Fragmentgemisches bestimmen läßt. Eine quantitative Analyse dieses Fragmentgemisches ist jedoch nur möglich, wenn eine überschaubare Zahl von Fragmenten entsteht. Dies trifft gewöhnlich für kleine Bakteriophagen- oder auch Plasmid-DNAs zu, nicht aber für die großen eukaryontischen DNAs, die eine sehr viel größere Komplexität besitzen. Aus diesem Grunde wurden die Histon-DNA-Komplexe mit einer Phagen- bzw. Plasmid-DNA rekonstituiert. Die Verwendung einer nichthomologen DNA scheint gerechtfertigt zu sein, da Nukleohistonkomplexe, die aus Kalbsthymushistonen und Bakteriophagen-DNA rekonstituiert wurden, sich sehr ähnlich wie Komplexe mit der homologen eukaryontischen DNA verhalten, wenn man ihre Röntgenbeugungsdiagramme (36), Schmelzkurven, Viskosität und ihre elektronenoptisch darstellbaren Strukturen vergleicht (37).

2.1.1. Vorversuche mit PM2-DNA

2.1.1.1. Präparation linearer PM2-DNA mit Hilfe von Restriktionsnukleasen aus *H. influenzae*

Nukleohistonkomplexe sollten zunächst mit der DNA des Pseudomonas-Phagen PM2 rekonstituiert werden, die ein Molekulargewicht von etwa 6×10^6 besitzt (38). PM2-DNA wurde, wie unter 4.1.1. angegeben, isoliert bzw. zum Teil von R. E. Streeck zur Verfügung gestellt. Gewöhnlich wurde ein Gemisch von ca. 50 % kovalent-geschlossener-zirkularer Form ("supercoil" oder Form I-DNA), ca. 40 % offen-zirkularer Form (Form II-DNA) und ca. 10 % linearer Form (Form III-DNA) erhalten. Die ungewöhnlich hohe Verunreinigung der Form I der PM2-DNA mit Form II und Form III beruht möglicherweise auf einer einzelstrang-spezifischen Nuklease, die mit in den Phagen eingepackt wird (39).

Um einen Einfluß der Konformation der DNA in Form I und Form II auf die Histon-DNA-Wechselwirkung auszuschließen, sollten die Rekonstitutionsversuche mit der linearen Form III vorgenommen werden. Dazu wurde die Fraktion aus dem CsCl-Propidiumdijodid-Gradienten, die Form I-PM2-DNA enthielt und zu ca. 10 % mit Form II und III verunreinigt war, mit Restriktionsnukleasen aus *Hämophilus influenzae* (Gemisch aus Hind II und Hind III) gespalten. Die Spaltung durfte jedoch nicht vollständig ablaufen, da PM2-DNA für die Enzyme mehrere Spaltstellen besitzt. Abb. 1 zeigt, daß mit zunehmender Inkubationszeit unter Verbrauch von Form I zunächst der Anteil der linearen Form III zunahm, bevor deutliche Mengen an kleineren Fragmenten entstanden. Die Restriktionsnukleasen spalten offensichtlich beide Stränge der DNA-Doppelhelix gleichzeitig, da der

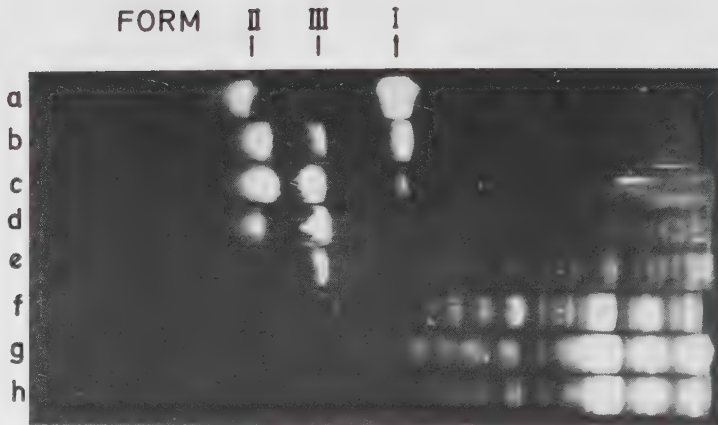


Abb. 1 Spaltung von PM2-DNA mit Restriktionsnukleasen aus *H. influenzae*

Je 0,2 A₂₆₀-Einheiten PM2-DNA wurden in 20 μ l Standardpuffer (40) mit einer konstanten Menge Enzym verschiedene Zeiten bei 30 °C gespalten (a - h): 0, 15, 30, 60, 120, 240, 480 und 600 Min. . Die Spaltungen wurden mit 5 μ l 0,1 M EDTA, pH 8,0 gestoppt und nach Zugabe von 5 μ l 50 % Saccharose in 1 %igen Agarose-Äthidumbromid-Gelen analysiert (6 Std., 50 V). Die Auftrennung der DNA erfolgte von links nach rechts. Die Banden, die den drei Formen der PM2-DNA entsprechen, sind bezeichnet.

Zunahme an linearer DNA keine Zunahme an offen-zirkularer DNA vorausging. Durch Variation der Inkubationszeit, der DNA-Konzentration und der Enzymkonzentration wurden Bedingungen ermittelt, unter denen eine maximale Menge an linearer DNA erhalten wurde. Die lineare DNA wurde, wie unter 4.1.1. beschrieben, mit einer Gesamtausbeute von 25 % (bezogen auf die gespaltene DNA-Menge) isoliert, doch enthielt sie immer noch ca. 40 % Form II-DNA. Es gelang demnach in der präparativen Elektrophorese (41) keine befriedigende Trennung zwischen offen-zirkularer und linearer DNA. Im analytischen Maßstab führte die Methode (41) jedoch zu einer quantitativen Trennung.

Die Präparation linearer PM2-DNA könnte heute sehr viel leichter über die Spaltung der Form I mit der Restriktionsnuklease aus *Hämophilus parainfluenzae* vorgenommen werden, die auf der DNA nur eine Spaltstelle besitzt (42). Dieser Befund war zum Zeitpunkt der Versuche jedoch unbekannt.

2.1.1.2. Darstellung und Charakterisierung von Komplexen aus PM2-DNA und Histon H1

Komplexe mit unterschiedlichen H1/DNA-Verhältnissen wurden aus der gespaltenen PM2-DNA (Gemisch aus 40 % Form II und 60 % Form III) und reinem, säureextrahierten H1 rekonstituiert (4.4.1.). Die Ausbeuten (bezogen auf Absorption bei 260 nm) betrugen zwischen 90 und 110 %. Alle Komplexe waren löslich, d. h. sie ließen sich nicht durch 5 Min. Zentrifugation bei 1000 x g sedimentieren.

Eine Fraktionierung der rekonstituierten Komplexe im Saccharose-Gradienten war nicht möglich: Außer im Falle des Komplexes mit einem H1/DNA-Verhältnis von 1,25 mg/mg sedimentierten ca. 80 - 100 % des aufgetragenen Materials in einer Bande (vom Komplex mit 1,25 mg H1/mg DNA wurden 55 % in einer Bande erhalten). Bis zum H1/DNA-Verhältnis von 0,4 mg/mg veränderte sich der $S_{20,w}$ -Wert der Komplexe kaum, darüber nahm die Sedimentationskonstante linear mit dem Histon/DNA-Verhältnis zu (Abb. 2). Die kontinuierliche Zunahme der $S_{20,w}$ -Werte und das homogene Sedimentationsverhalten der Komplexe spricht gegen eine kooperative Abdeckung der DNA-Moleküle mit H1 unter den angegebenen Rekonstitutionsbedingungen. Unter anderen Bedingungen dagegen zeigen Histone kooperative Bindung an die DNA (37). Es wird jedoch diskutiert (43), ob kooperative Bindung allgemein über die ganze Länge des DNA-Moleküls erfolgt oder sich auf bestimmte Sequenzen beschränkt.

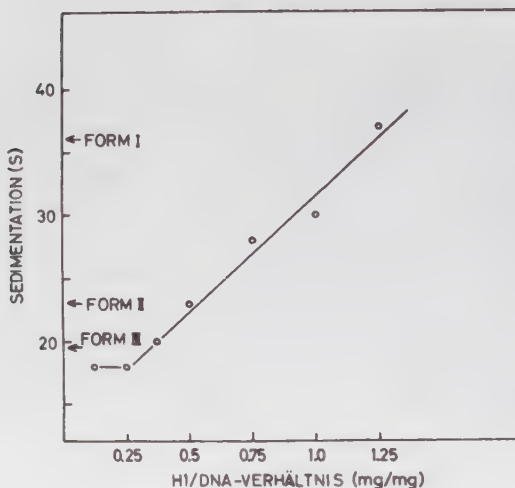


Abb. 2 Sedimentationskonstanten der H1-PM2-DNA-Komplexe 5 - 20 %ige, isokinetische Saccharose-Gradienten (in 2,5 mM NaCl, 0,25 mM EDTA, pH 7) wurden mit je 100 μ l Lösung der rekonstituierten Komplexe (0,14 - 0,18 A₂₆₀-Einheiten) überschichtet und im Beckman SW 56-Rotor bei 50.000 Upm und 5 °C 2,5 Std. zentrifugiert. S_{20,W}-Werte wurden relativ zu 18 S- und 28 S-rRNA bestimmt. Die S_{20,W}-Werte für die verschiedenen Formen der PM2-DNA sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Das Verhalten der Komplexe in der Elektrophorese in 0,6 %igen Agarosegelen spricht ebenfalls gegen eine kooperative Bindung von H1 an PM2-DNA. Wie Abb. 3 zeigt, verringerte sich die Wanderungsgeschwindigkeit der Komplexe mit zunehmender Menge an H1. Dies läßt sich durch Verminderung der negativen Bruttoladung der Komplexe erklären, da die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA zunehmend durch positiv geladene Aminosäurereste der H1-Moleküle kompensiert werden. Bei kooperativer Abdeckung des DNA-Moleküls mit H1 würde man bei Histon/DNA-Verhältnissen unterhalb

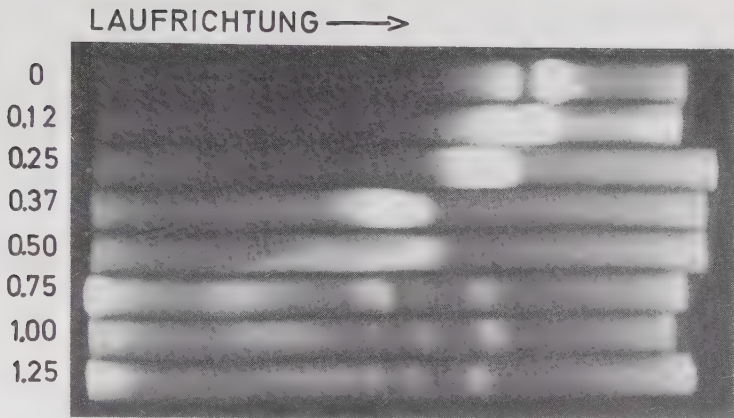


Abb. 3 Agarose-Gelelektrophorese der H1-PM2-DNA-Komplexe
Je 50 μ l Lösung der Komplexe (0,07 - 0,1 A₂₆₀-Einheiten) wurden mit 50 μ l 10 % Saccharose versetzt und in 0,6 %igen Agarose-Rundgelen in TEB-Puffer ohne Äthidiumbromid (4.6.1.) elektrophoretisch aufgetrennt (12 Std., 25 V). Nach dem Lauf wurde die DNA mit Äthidiumbromid angefärbt. Die H1/DNA-Verhältnisse (mg/mg) der Komplexe sind angegeben.

des Sättigungspunktes der DNA (etwa 0,7 mg H1/mg DNA, Ref. 44) das Auftreten von zwei Banden erwarten, den Komplex und die freie DNA. Abb. 3 zeigt, daß zumindest ab 0,37 mg H1/mg DNA keine freien DNA-Moleküle mehr vorhanden waren. Nachträgliche Anfärbung derselben Gele mit dem Proteinfarbstoff Coomassie Brilliantblau G 250 führte zu den gleichen Bandenmustern (Abb. 4 a). Daraus folgt, daß tatsächlich Protein-DNA-Komplexe elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Eine Kontrolle bestätigte, daß Coomassie nur Proteine, aber keine DNA anfärbte.

Interessant ist das Auftreten mehrerer Banden in der Elektrophorese von Komplexen mit mehr als 0,5 mg H1/mg DNA. Die Erhöhung des H1/DNA-Verhältnisses führte zu

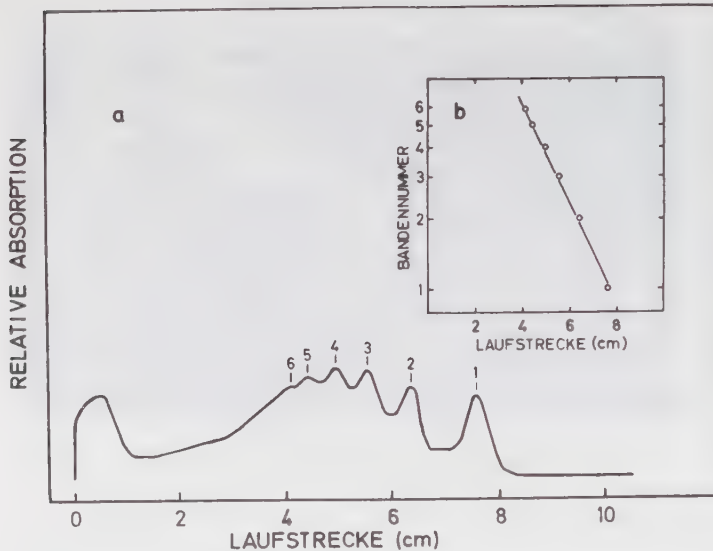


Abb. 4 Elektrophoretische Auftrennung des H1-PM2-DNA-Komplexes mit 1,25 mg H1/mg DNA

a, Densitogramm der elektrophoretischen Trennung des Komplexes in einem 0,6 %igen Agarosegel. Das Gel wurde mit dem Proteinfarbstoff Coomassie Brilliantblau G 250 gefärbt. b, Abhängigkeit des Logarithmus der Bandennummer von der Laufstrecke im Gel.

Komplexen, die trotz der Verminderung der negativen Bruttoladung schneller zur Anode wanderten als Komplexe mit kleinerem Histon/DNA-Verhältnis (Abb. 3). Das Auftreten von Komplexbanden mit erhöhter Beweglichkeit wird offenbar durch eine Eigenschaft von H1 verursacht, da ausgeschlossen werden konnte, daß die schneller wandernden Komplexe durch eine Fragmentierung der DNA entstanden waren. Außerdem wurde nachgewiesen, daß alle elektrophoretisch trennbaren Komplexe gleiche Anteile von Form II

und Form III der PM2-DNA enthielten. Das Verhalten der Komplexe in der Elektrophorese deutet demnach auf eine Konformationsänderung hin, die offenbar erst bei höheren H1/DNA-Verhältnissen möglich ist. Es ist bekannt, daß von den fünf Histonen H1 die Fähigkeit besitzt, Nukleo-histonkomplexe zu vernetzen (45). Möglicherweise beruht das Verhalten der Komplexe in der Elektrophorese auf dieser Eigenschaft von H1: Sättigung der DNA mit einer bestimmten Menge H1 führt zur Kondensation der Komplexe und gleichzeitig zu Aggregaten mit 1, 2, 3, 4 usw. DNA-Molekülen. Unterstützt wird diese Interpretation durch den Befund, daß der Logarithmus der Bandennummer eine lineare Funktion der Laufstrecke der jeweiligen Bande ist (Abb. 4 b). Das deutet darauf hin (46, 105), daß die den Banden entsprechenden Komplexe Molekulargewichte besitzen, die ganzzahlige Vielfache des Molekulargewichtes des am schnellsten wandernden Komplexes sind.

Das Auftreten von Komplexbanden mit erhöhter Beweglichkeit war nicht auf PM2-DNA beschränkt. Auch Komplexe aus H1 und linearer λ dv 21-DNA ergaben ein entsprechendes Muster. Die anderen vier Histone H2A, H2B, H3 und H4 ergaben mit PM2-DNA in analogen Rekonstitutionsversuchen keine Komplexe, die in der Elektrophorese zu einem ähnlichen Muster wie die H1-PM2-DNA-Komplexe mit mehr als 0,5 mg H1/mg DNA aufgetrennt wurden (0,55 und 1,1 mg Histon/mg DNA wurden untersucht).

2.1.1.3. Spaltung von H1-PM2-DNA-Komplexen mit Restriktionsnuklease Hind III

PM2-DNA wird von Hind III in sieben Fragmente gespalten, die sich in 2 %igen Agarosegelen auftrennen lassen. Für Chromatin ist bekannt, daß es unter den für die En-

zymspaltung optimalen Bedingungen (6,6 mM $MgCl_2$, 60 mM NaCl; Ref. 47) unlöslich ist (48). Auch die Löslichkeit (Überstand nach 1 Std. Zentrifugation bei 1000 x g) der H1-PM2-DNA-Komplexe war von den Salzkonzentrationen und dem Histon/DNA-Verhältnis abhängig; z. B. waren Komplexe ab 0,83 mg H1/mg DNA bereits unter Bedingungen unlöslich (1 mM $MgCl_2$, 60 mM NaCl), unter denen die Nuklease nur 40 % ihrer Aktivität besitzt.

Trotz Unlöslichkeit wurden die Komplexe unter optimalen Salzbedingungen gespalten, in der Hoffnung, daß auch Komplexe in Suspension durch das Enzym angegriffen werden. Nach der Spaltung zeigte die elektrophoretische Trennung der DNA-Fragmente in 2 %igen Agarose-SDS-Gelen, daß durch Komplexierung der DNA mit 0,12 - 0,5 mg H1/mg DNA keine Hind III-Spaltstelle spezifisch geschützt worden war. Alle Fragmente, die nach Spaltung der freien DNA auftraten, entstanden auch durch Spaltung der H1-DNA-Komplexe. Die unlöslichen Komplexe mit mehr als 0,5 mg H1/mg DNA wurden unter gleichen Bedingungen nur wenig gespalten; sie wurden jedoch mit längeren Inkubationszeiten zunehmend abgebaut.

2.1.1.4. Zusammenfassung und Wertung der Vorversuche

In den Vorversuchen mit PM2-DNA konnte gezeigt werden, daß H1-PM2-DNA-Komplexe unter den angegebenen Rekonstitutionsbedingungen nicht nach einem kooperativen Mechanismus gebildet wurden. Von den fünf Kalbsthymushistonen hatte nur H1 die Fähigkeit, mit DNA multimere Komplexe zu bilden, die in der Elektrophorese in eine Reihe von definierten Banden aufgetrennt wurden und deren Bildung offenbar auf der Eigenschaft von H1 beruht, Nukleohistone komplexe kondensieren und vernetzen zu können.

Weiterhin wurde gezeigt, daß sich H1-PM2-DNA-Komplexe mit Restriktionsnuklease Hind III unter den für das Enzym optimalen Bedingungen spalten ließen. Unter Anwendung dieser Methode gelang es jedoch nicht, die Frage nach einer Spezifität in der Histon-DNA-Wechselwirkung zu beantworten. Um eine mögliche präferentielle Bindung von H1 an bestimmte Spaltstellen genauer, d. h. quantitativ studieren zu können, wäre es nötig, außer den Endfragmenten auch die Partialfragmente in der Elektrophorese aufzulösen, um sie identifizieren und quantifizieren zu können. Das war jedoch in dem PM2-DNA-Hind-III-System zum Zeitpunkt der Versuche nicht möglich, da die inzwischen bekannte physikalische Karte der Hind III-Spaltstellen auf der DNA (42 und R. E. Streeck, pers. Mitteilung) damals noch unbekannt war. Für alle weiteren Untersuchungen zur präferentiellen Bindung von Histonen an bestimmte DNA-Sequenzen wurde deshalb die kleine Plasmid-DNA λ dv 21 gewählt, für die diese Voraussetzung erfüllt war.

2.1.2. Hind II-Spaltung von Komplexen aus linearer λ dv 21-DNA und einzelnen Histonen

Mit der Abkürzung λ dv bezeichnet man Plasmide, die aus dem Escherichia coli Phagen λ durch DNA-Verlust (Deletion) hervorgegangen sind und die sich autonom replizieren können (49). Alle λ dv-Plasmide enthalten noch die Gene und Regulationsfunktionen des Phagen λ , die für die autonome DNA-Replikation nötig sind. Dazu gehören der rechte Promotor und Operator P_{RO} , das Autorepressor-Gen cro (=tof), die DNA-Replikations-Gene O und P sowie der Replikationsstartpunkt ori .

λ dv 21 ist eine relativ kleine Plasmid-DNA mit einem Molekulargewicht von $2,12 \times 10^6$. Von dieser DNA ist die

physikalische Karte der Spaltstellen einer Reihe verschiedener Restriktionsnukleasen bekannt (50). Zur Präparation der DNA wurden E.coli-Zellen verwendet, die das Plasmid als dimeres, zirkulares Molekül enthielten (51).

λ dv 21-Form-I-DNA wurde vorweg mit der Restriktionsnuklease Hind III, die auf der monomeren λ dv 21-DNA nur eine Spaltstelle besitzt (50), linearisiert. Eine konstante Menge lineare DNA wurde dann mit steigenden Mengen Kalbsthymushistonen rekonstituiert (4.4.2.), (meistens 0,1 , 0,2 , 0,4 und 1,0 mg Histon/mg DNA). Zunächst wurden Komplexe mit einzelnen, salzextrahierten Histonen sowie zum Vergleich mit Polylysin und Polyarginin gebildet. Nach der Rekonstitution waren alle "Lösungen" der Komplexe mit 1 mg Histon/mg DNA (außer dem H2A-DNA-Komplex) trübe, ferner diejenigen, die pro mg DNA jeweils 0,4 mg H1, Polylysin oder Polyarginin enthielten. Alle anderen Komplexe ergaben klare Lösungen. Die Ausbeuten an komplexierter DNA wurden photometrisch (bei 260 nm) bestimmt und betrugen ca. 80 - 100 %.

Die Histonverteilung auf dem linearen λ dv 21-DNA-Molekül sollte nun durch Spaltung der Komplexe mit Restriktionsnuklease untersucht werden, um hieraus Rückschlüsse auf eine sequenzspezifische Bindung der Histone ziehen zu können. Hind II besitzt auf der DNA fünf Spaltstellen (Abb. 5 b). Um sich ein Bild von der Auftrennung der zu erwartenden Partialfragmente zu machen und um zu prüfen, ob alle fünf Stellen der histonfreien DNA ungefähr mit gleicher Geschwindigkeit gespalten werden, wurde als erstes eine Kinetik der Spaltung der histonfreien DNA aufgenommen. Abb. 5 a zeigt, daß sich alle Endfragmente und der größte Teil der Partialfragmente auf 4 %igen Polyacrylamidgelen gut auflösen ließen. Außerdem läßt sich an den Mengenverhältnissen, in denen die Fragmente im

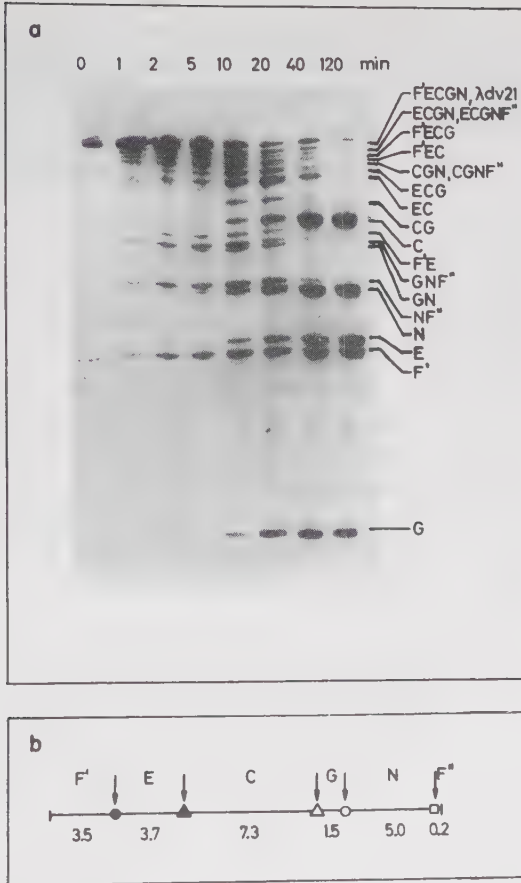


Abb. 5 Spaltung linearer λ dv 21-DNA mit Hind II

a, Je 0,2 A₂₆₀-Einheiten Hind III-gespaltener λ dv 21-DNA wurden in 250 μ l Standardpuffer (40) verschiedene Zeiten mit einer konstanten Menge Hind II bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden mit Phenol extrahiert, die DNA wurde mit Äthanol gefällt und in 20 μ l 20 % Saccharose, 0,003 % Bromphenolblau aufgenommen. Die DNA-Fragmente wurden in einem 4 %igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Toluidinblau angefärbt. Das Fragment F'' lief mit der Anionenfront (nicht gezeigt). b, Physika-

lische Karte der Hind II-Spaltstellen auf der linearen λ dv 21-DNA (50). Die Hind III-Spaltstelle liegt im Fragment F, das durch Hind III in F' und F'' gespalten wird. Die Molekulargewichte der Fragmente (R. E. Streeck, pers. Mitteilung) sind angegeben.

Laufe der Spaltung gebildet wurden, erkennen, daß die Restriktionsnuklease die DNA nicht an allen fünf Stellen mit gleicher Geschwindigkeit spaltete. So ist zu beobachten, daß das Fragment E im Laufe der Inkubation langsamer auftrat als z. B. die Fragmente G und N, für deren Bildung jeweils zwei Spaltungen der λ dv 21-DNA durch Hind II nötig sind. Auch das größte Fragment C wurde relativ langsam herausgespalten, während das Fragment F' auf der anderen Seite von E sehr schnell entstand. Das bedeutet, daß die Spaltstelle zwischen E und C relativ langsam gespalten wurde. In Übereinstimmung damit blieb das Partialfragment EC relativ lange ungespalten.

Abb. 6 a zeigt die Fragmentmuster, die durch Spaltung der H2A- λ dv 21-DNA-Komplexe mit Hind II erhalten wurden. Zunächst läßt sich feststellen, daß Hind II-Spaltstellen durch das Histon geschützt wurden, da unter den Bedingungen, unter denen die histonfreie DNA gerade vollständig gespalten wurde, beim Abbau der Komplexe Partialfragmente auftraten. Das Fragmentmuster, das durch den Schutz von Spaltstellen durch das Histon H2A zustandekam, war jedoch vollkommen verschieden von Partialmustern, die mit histonfreier DNA erhalten werden konnten (vgl. Abb. 5 a). Das bedeutet, daß durch H2A die fünf Spaltstellen auf der DNA vor der Nuklease unterschiedlich geschützt wurden. Dieser Unterschied ist leicht aus dem Fragmentmuster herauszulesen, das durch Spaltung des Komplexes mit 1 mg H2A/mg DNA erhalten wurde (Abb. 6 a, b): Hier fehlen die Endfragmente C, E und F', dagegen findet man das Partialfragment F'EC. Demnach wurden durch H2A die

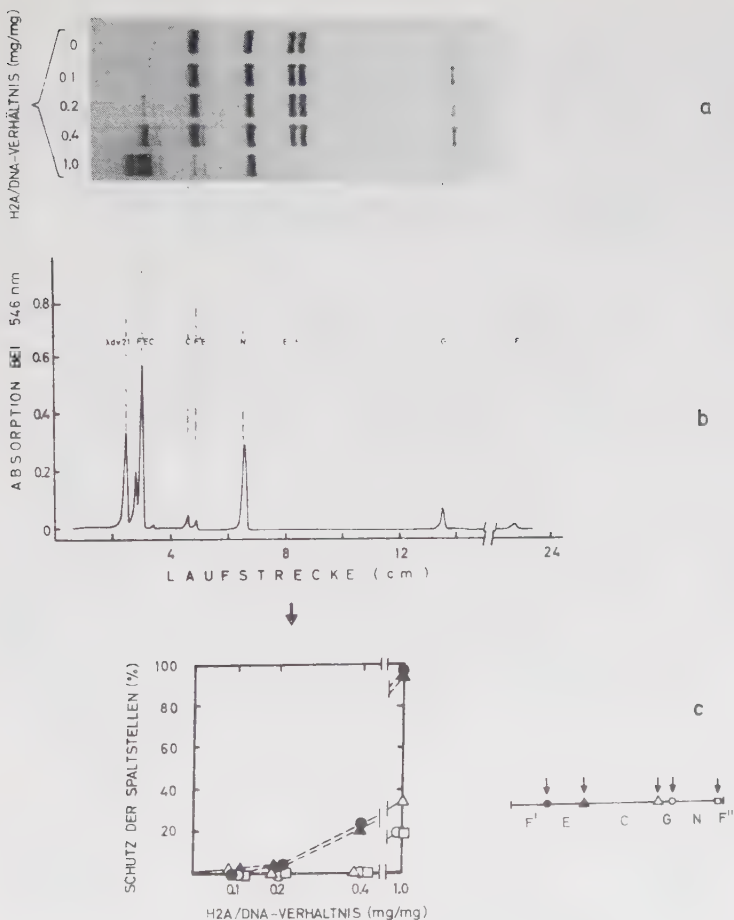


Abb. 6 Schutz von Hind II-Spaltstellen auf der linearen λ dv 21-DNA durch H2A

a, Polyacrylamid-Gelelektrophorese der DNA-Fragmente nach Spaltung der H2A-DNA-Komplexe (0,1 , 0,2, 0,4 und 1,0 mg H2A/mg DNA) mit Hind II. Je 0,2 A₂₆₀-Einheiten wurden in 250 μ l Standardpuffer (40) 1 Std. bei 37 °C mit einer Enzymmenge inkubiert, die gerade zur vollständigen

digen Spaltung der histonfreien DNA ausreichend war. Die DNA wurde isoliert und in 30 μ l 20 % Saccharose, 0,003 % Bromphenolblau gelöst, auf ein 4 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde mit Toluidinblau gefärbt. b, Densitogramm der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente, die durch Spaltung des Komplexes mit 1 mg H2A/mg DNA entstanden (Abb. 6 a, letzter Gelstreifen). c, Quantitative Auswertung des Schutzes der verschiedenen Hind II-Spaltstellen durch H2A (Erläuterungen s. 4.7.)

beiden linken Spaltstellen zwischen F' und E und zwischen E und C sehr viel besser als die drei rechten Spaltstellen geschützt. Die quantitative Auswertung bestätigt diese Abschätzung. In Abb. 6 c ist das Ausmaß des Schutzes der einzelnen Spaltstellen gegen das H2A/DNA-Verhältnis aufgetragen. Die fünf verschiedenen Spaltstellen sind mit unterschiedlichen Symbolen gekennzeichnet. Die resultierenden Kurven zeigen deutlich, daß die beiden linken Spaltstellen durch H2A sehr viel stärker geschützt wurden als die drei rechten Spaltstellen. Eine der beiden linken Spaltstellen, die zwischen E und C, wurde auch in der histonfreien DNA relativ langsam gespalten. Im H2A-DNA-Komplex waren jedoch die Unterschiede in den Spaltgeschwindigkeiten deutlich stärker ausgeprägt, so daß im Komplex auch an dieser Stelle präferentieller Schutz vorlag.

In Komplexen, die aus linearer λ dv 21-DNA und je einem der anderen Histone rekonstituiert worden waren, wurde ebenfalls präferentieller Schutz der beiden linken Spaltstellen gefunden (Abb. 7). Der präferentielle Schutz durch die einzelnen Histone war jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt und nahm etwa in der Reihenfolge H2A > H1 > H2B > H3 $\approx$ H4 ab. Außerdem war die Fähigkeit der Histone, die DNA allgemein vor Spaltung zu schützen, sehr unterschiedlich (Abb. 7). H1, z. B., schützte die DNA unter den angegebenen Bedingungen bereits ab 0,2 mg/

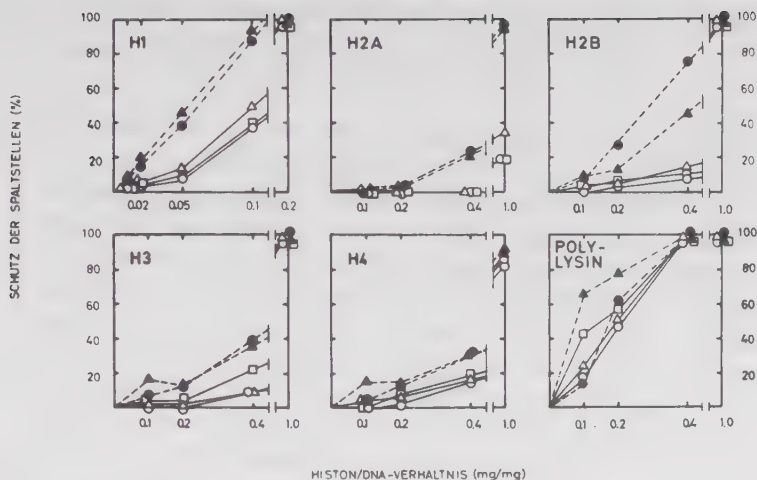


Abb. 7 Schutz von Hind II-Spaltstellen auf der linearen λ dv 21-DNA durch einzelne Histone und Polylysin

Histon- λ dv 21-DNA-Komplexe wurden analog den H2A-DNA-Komplexen, wie in der Legende zu Abb. 6 beschrieben, rekonstituiert, mit Hind II gespalten und analysiert.

mg DNA vollständig vor Spaltung, während im H2A-DNA-Komplex unter diesen Bedingungen nahezu alle Stellen gespalten wurden. Polylysin und Polyarginin konnten die DNA ebenfalls sehr gut vor Nukleasespaltung schützen (ab 0,4 mg/mg DNA vollständiger Schutz unter gleichen Bedingungen), zeigten jedoch nicht die gleiche Präferenz wie die Histone für die linken Spaltstellen. Unter drastischeren Spaltungsbedingungen (mehr Nuklease, längere Inkubationszeiten) konnten alle Histon-DNA-Komplexe vollständig gespalten werden. Die Nuklease war demnach in der Lage, die Histone von den Spaltstellen zu verdrängen.

2.1.3. Hind II-Spaltung von Komplexen aus linearer λ dv 21-DNA und $(H3)_2(H4)_2$ -Tetramer

Der $(H3)_2(H4)_2$ -Tetramerkomplex, der im Chromatinmodell (7) den inneren Teil des Nukleosoms bildet, wurde, wie unter 4.2.2. beschrieben, isoliert. Histon-DNA-Komplexe wurden aus λ dv 21-DNA und dem Tetramerkomplex ohne Harnstoff rekonstituiert, um den $(H3)_2(H4)_2$ -Komplex nicht zu denaturieren. Hind II-Spaltung des Histon-DNA-Komplexes ergab, daß der Tetramerkomplex ebenso wie die einzelnen Histone präferentiell die beiden linken Spaltstellen vor der Nuklease schützte (Abb. 8 a und 9 a). Der bevorzugte Schutz dieser beiden Spaltstellen durch den $(H3)_2(H4)_2$ -Komplex war sogar sehr viel ausgeprägter als für die beiden Histone H3 und H4 allein (vgl. Abb. 7). Wenn Komplexe aus λ dv 21-DNA und dem $(H3)_2(H4)_2$ -Tetramer nach der gleichen Salz-Harnstoff-Methode (4.4.2.) wie für einzelne Histone (Abb. 7) rekonstituiert wurden, konnte beim Abbau der Komplexe mit Hind II nur noch ein Schutz geringer Spezifität gefunden werden, ähnlich wie er für H3 und H4 allein beobachtet wurde. Es ist möglich, daß der $(H3)_2(H4)_2$ -Komplex unter den Startbedingungen (5 M Harnstoff, 2 M NaCl) dissoziiert wird (52) und H3 und H4 im Laufe der Rekonstitution getrennt an die DNA binden, bevor sich der Tetramerkomplex zurückgebildet hat. Eine solche Reassoziatioin des Tetramerkomplexes in Abwesenheit von DNA ist durch Entfernung des Harnstoffs durch Dialyse möglich (52).

Der bevorzugte Schutz bestimmter Restriktionsnuklease-Spaltstellen durch den Tetramerkomplex war nicht auf Hind II-Spaltstellen beschränkt. Auch das Fragmentmuster, das durch Spaltung der ohne Harnstoff rekonstituierten $(H3)_2(H4)_2$ -DNA-Komplexe (Legende Abb. 8 a) mit der Restriktionsnuklease Bsu entstand (in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 ,

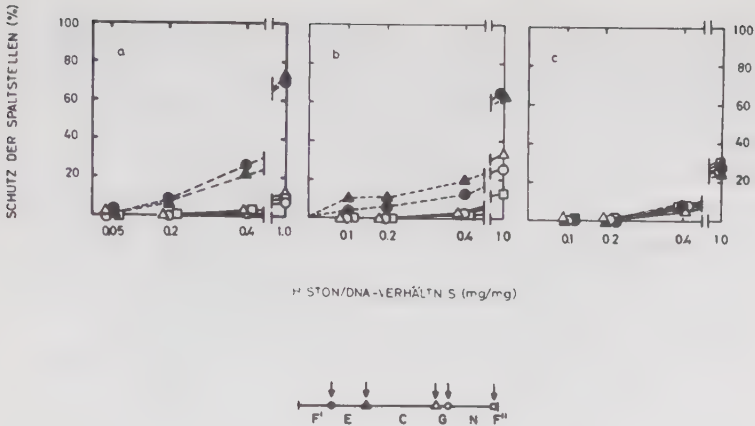


Abb. 8 Schutz von Hind II-Spaltstellen auf der linearen λ dv 21-DNA durch ein Gemisch aus H3 und H4

a, Je 50 μ g lineare λ dv 21-DNA wurden in 650 μ l 2 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit 2, 5, 10, 20 und 50 μ g $(H3)_2(H4)_2$ gemischt und gegen 5 l 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 mM EDTA dialysiert. b, Histon-DNA-Komplexe wurden mit $(H3)_2(H4)_2$ im Salz-Harnstoff-Gradienten, wie unter 4.4.2. beschrieben, und c, im Salz-Gradienten ohne Harnstoff bei 37 °C, wie unter 4.4.4. angegeben, rekonstituiert. Die rekonstituierten Komplexe wurden mit Hind II gespalten und die DNA-Fragmente, wie für H2A-DNA-Komplexe angegeben, analysiert.

10 mM $MgCl_2$, 5 mM β -Mercaptoäthanol), unterschied sich von solchen, die im Laufe der Spaltung der histonfreien DNA auftraten. Eine quantitative Auswertung war in diesem Fall nicht möglich wegen der vielen Partialfragmente, die nicht aufgelöst werden konnten. Aus dem Fragmentmuster ließ sich jedoch ablesen, daß durch den $(H3)_2(H4)_2$ -Komplex zwei Bsu-Spaltstellen präferentiell geschützt wurden, die in Nachbarschaft zur präferentiell geschützten Hind II-Spaltstelle zwischen F' und E lagen (vgl. physikalische Karte der Bsu-Spaltstellen in Ref. 50).

Der präferentielle Schutz von Spaltstellen auf der linken Seite der linearen λ dv 21-DNA könnte durch bevorzugte Bindung der Histone bzw. des $(H3)_2(H4)_2$ -Komplexes an bestimmte DNA-Sequenzen in unmittelbarer Nähe der Spaltstellen erklärt werden. Es sollte jedoch betont werden, daß mit Hilfe dieser Versuche nicht darüber entschieden werden kann, ob die Histone im Histon-DNA-Komplex vorwiegend an diesen Stellen lokalisiert sind oder - bei gleichmäßiger Verteilung über das DNA-Molekül - aufgrund der DNA-Sequenz unterschiedlich binden. Die Hind II-Spaltstelle zwischen F' und E liegt in der rechten Operator- und Promotorregion des λ -Phagen, für die die DNA-Sequenz bekannt ist (53, 54). Die Sequenz besteht aus Segmenten von jeweils 12 Np, die alternierend AT- und GC-reich sind (53). Diese Mikroheterogenität in der DNA-Sequenz könnte sowohl die bevorzugte Bindung von lysin- als auch argininreichen Histonen erklären, da lysinreiche Histone präferentiell an AT-reiche Sequenzen (33) und argininreiche Histone bevorzugt an GC-reiche Sequenzen binden (32). Die in dieser Arbeit beschriebene präferentielle Bindung der Histone erfolgt jedoch nicht ausschließlich durch die Lysin- bzw. Argininreste der Histone, da beim Abbau der Polylysin-DNA- bzw. Polyarginin-DNA-Komplexe kein präferentieller Schutz der beiden linken Hind II-Spaltstellen wie bei den Histonen gefunden wurde.

2.1.4. Hind II-Spaltung von Komplexen aus linearer λ dv 21-DNA und Histonmischungen

Der präferentielle Schutz der beiden linken Hind II-Spaltstellen durch Histone wurde nicht gefunden, wenn Komplexe aus λ dv 21-DNA und einem Gemisch der vier Histone H2A, H2B, H3 und H4 rekonstituiert wurden. Abb. 9 zeigt, daß

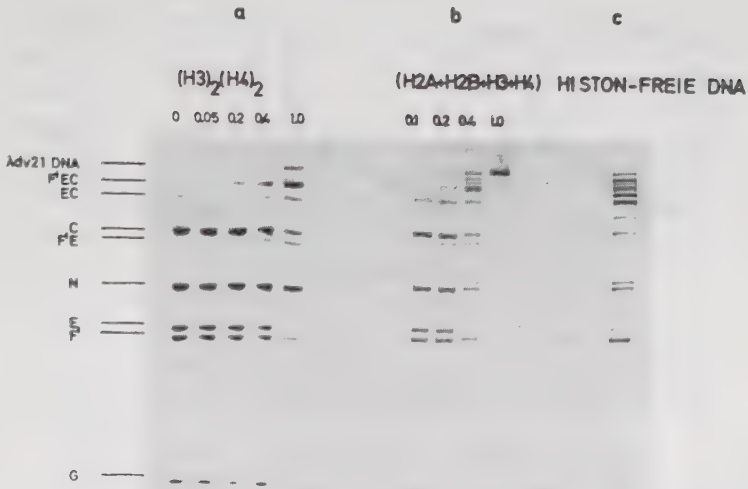


Abb. 9 Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente nach Hind II-Spaltung von Komplexen aus linearer λ dv 21-DNA und Histonmischungen

a, Hind II-Fragmentmuster des $(H3)_2(H4)_2$ - λ dv 21-DNA-Komplexes (s. Legende zu Abb. 8 a) b, Hind II-Fragmentmuster des $(H2A + H2B + H3 + H4)$ - λ dv 21-DNA-Komplexes. Die Komplexe wurden aus linearer λ dv 21-DNA und salzextrahierten, gereinigten Histonen im Salz-Harnstoff-Gradienten (4.4.2.) rekonstituiert, gespalten, die DNA-Fragmente isoliert und analysiert wie in der Legende zu Abb. 6 beschrieben. c, Partialsplattung der histonfreien λ dv 21-DNA (Experimentelle Details s. Legende zu Abb. 5 a).

diese Komplexe bei Spaltung mit Hind II ein Fragmentmuster ergaben, das dem einer Partialsplattung der histonfreien DNA sehr ähnlich sah, während das zum Vergleich gezeigte Muster des $(H3)_2(H4)_2$ - λ dv 21-DNA-Komplexes deutlich davon abwich. Daraus folgt, daß das Gemisch der vier Histone im Gegensatz zum $(H3)_2(H4)_2$ -Tetramer einen gleichmäßig

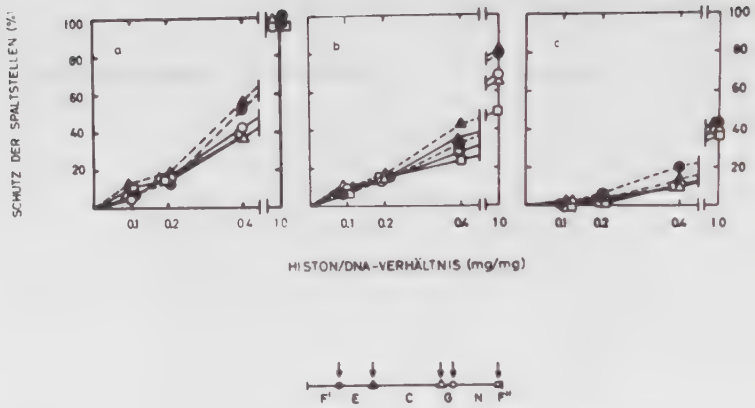


Abb. 10 Schutz von Hind II-Spaltstellen auf der linearen λ dv 21-DNA durch ein Gemisch der vier Histone H2A, H2B, H3 und H4

Histon-DNA-Komplexe wurden im angegebenen Histon/DNA-Verhältnis **a**, im Salz-Harnstoff-Gradienten (4.4.2.), **b**, im Salz-Gradienten ohne Harnstoff bei 4 °C (4.4.3.) und **c**, im Salz-Gradienten ohne Harnstoff bei 37 °C (4.4.4.) rekonstituiert und nach Zusatz von Standardpuffer (40) mit Hind II gespalten. Der Schutz der Spaltstellen durch die vier Histone wurde, wie in der Legende zu Abb. 6 beschrieben, bestimmt.

auf die ganze DNA verteilten Schutz ausübte. Die quantitative Auswertung bestätigt das. Abb. 10 zeigt, daß alle fünf Spaltstellen annähernd im gleichen Maß geschützt wurden.

Es ist bekannt, daß ein Gemisch der vier Histone H2A, H2B, H3 und H4 nötig ist, um mit DNA Komplexe zu rekonstituieren, die den im Chromatin gefundenen Nukleosomen ähnlich sind (6, 15). Dieser Befund stützt sich auf Röntgenbeugungsexperimente (6) und elektronenmikroskopische Untersuchungen (15). Um zu prüfen, ob sich unter

den hier verwendeten Rekonstitutionsbedingungen ebenfalls den Nukleosomen ähnliche Untereinheiten gebildet hatten, wurden die Komplexe mit Mikrokokkus-Nuklease inkubiert. Der Abbau des rekonstituierten Komplexes [1,0 mg (H2A + H2B + H3 + H4)/mg DNA] mit Mikrokokkus-Nuklease ergab diskrete DNA-Fragmente von ungefähr 160 Np (Monomer) und 290 Np (Dimer). Dagegen wurden keine diskreten DNA-Fragmente in diesem Bereich gefunden, wenn Komplexe nur mit den Histonpaaren (H2A + H2B) und (H3 + H4) im Salz-Harnstoff-Gradienten (4.4.2.) rekonstituiert und mit Mikrokokkus-Nuklease gespalten wurden. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Befund überein, daß alle vier kleinen Histone nötig sind, um Untereinheiten zu rekonstituieren (6, 15).

Der leicht präferentielle Schutz der beiden linken Spaltstellen in einigen Komplexen aus DNA und den vier kleinen Histonen (Abb. 10 a, b) wird möglicherweise durch unvollständige Bildung der Untereinheiten verursacht. Eine ausführliche Diskussion des Abbaus rekonstituierter Komplexe und Chromatin durch Mikrokokkus-Nuklease findet sich in Teil 2.2.1. der Arbeit.

Wenn H1 zusätzlich zu den vier Histonen, die zum Aufbau der Untereinheiten benötigt werden, zum Rekonstitutionsansatz gegeben wurde, wurde im Komplex ein verstärkter Schutz aller fünf Spaltstellen gefunden (Abb. 11). Zusätzlich wurden wieder die beiden linken Spaltstellen bevorzugt geschützt. Inkubation des Komplexes (1 mg Histon/mg DNA) mit Mikrokokkus-Nuklease führte auch in diesem Fall zu diskreten DNA-Fragmenten von etwa 160 Np und 290 Np. Das bedeutet möglicherweise, daß H1 unabhängig von den vier Histonen, die Untereinheiten bilden, an die DNA bindet.

Nach den Hind II-Spaltungen wurden die mit Phenol extra-

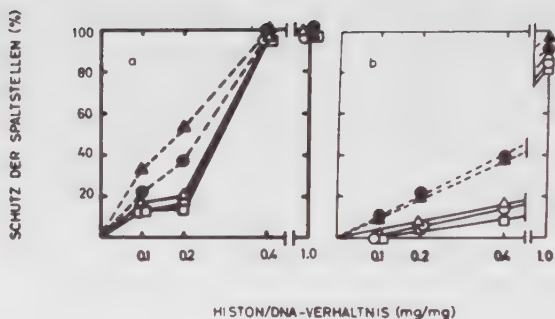


Abb. 11 Schutz von Hind II-Spaltstellen auf der linearen λ dv 21-DNA durch ein Gemisch der fünf Histone

Histon-DNA-Komplexe wurden a, im Salz-Harnstoff-Gradienten (4.4.2.) und b, im Salz-Gradienten ohne Harnstoff bei 37 °C (4.4.4.) rekonstituiert und mit Hind II gespalten. Der Schutz der Spaltstellen durch die fünf Histone wurde, wie in der Legende zu Abb. 6 beschrieben, bestimmt.

hierten Histone zur Kontrolle auf SDS-Gelen analysiert, um zu prüfen, ob während der Rekonstitution und Inkubation mit Nuklease proteolytischer Abbau aufgetreten war (untersucht wurden alle Komplexe mit 1 mg Histon/mg DNA). Es hatte kein Abbau der Histone stattgefunden.

2.1.5. Einfluß der Rekonstitutionsbedingungen auf die Hind II-Spaltung

Im Laufe der im zweiten Teil dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurde die Rekonstitutionsmethode optimiert, um

Histon-DNA-Komplexe mit möglichst gleichmäßig aneinandergereihten Untereinheiten zu erhalten. Dabei wurden die rekonstituierten Komplexe aufgrund der DNA-Fragmentmuster beurteilt, die nach Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease entstanden. Es zeigte sich, daß Rekonstitution von Histon-DNA-Komplexen in einem Salz-Gradienten ohne Harnstoff (4.4.3. oder 4.4.4.) zu einem DNA-Fragmentmuster mit höheren Oligomeren führte als Rekonstitution in Gegenwart von Harnstoff. Auch die Rekonstitution ohne Harnstoff ergab Histon-DNA-Komplexe, in denen durch einzelne Histone präferentiell die beiden linken Spaltstellen, dagegen durch das Gemisch der vier kleinen Histone annähernd gleichmäßig alle fünf Spaltstellen vor Hind II-Spaltung geschützt wurden (Abb. 10 b und c und Abb. 12). Komplexe, die zusätzlich zu den anderen vier Histonen H1 enthielten, zeigten ebenfalls unter diesen Rekonstitutionsbedingungen erneut bevorzugten Schutz der beiden linken Hind II-Spaltstellen (Abb. 11 b).

Darüber hinaus zeigt ein Vergleich der beiden Rekonstitutionsmethoden, daß die Rekonstitution ohne Harnstoff, wie unter 4.4.3. und 4.4.4. beschrieben, zu Komplexen führte, in denen das Ausmaß des präferentiellen Schutzes durch einzelne Histone (H2A und H2B wurde untersucht) allgemein geringer war als in Komplexen, die nach der Salz-Harnstoff-Methode (4.4.2.) rekonstituiert worden waren; eine Ausnahme bildeten die H1-DNA-Komplexe (vgl. Abb. 7 und 12). Es ist jedoch möglich, daß die Unterschiede im Ausmaß des präferentiellen Schutzes zwischen den verschiedenen rekonstituierten Komplexen zum Teil auf eine extensivere Spaltung der in Abb. 12 gezeigten Komplexe zurückzuführen sind.

Besonders empfindlich gegenüber der Rekonstitutionsprozedur zeigte sich die Bindung des $(H3)_2(H4)_2$ -Tetramerkomplexes: Wie beschrieben, ergaben $(H3)_2(H4)_2$ -DNA-Kom-

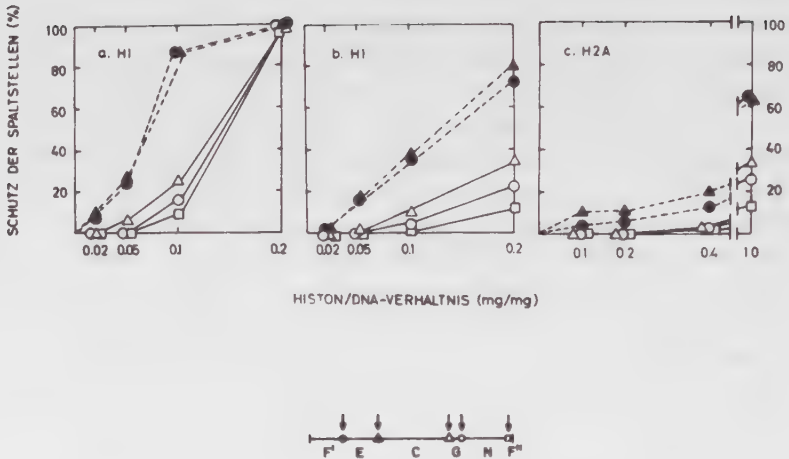


Abb. 12 Schutz von Hind II-Spaltstellen in H1- und H2A- λ dv 21-DNA-Komplexen nach Rekonstitution im Salz-Gradienten ohne Harnstoff

Histon-DNA-Komplexe wurden in den angegebenen Histon-DNA-Verhältnissen im Salz-Gradienten ohne Harnstoff aus linearer λ dv 21-DNA und a, H1 bei 4 °C (4.4.3.), b, H1 bei 37 °C (4.4.4.) und c, H2A bei 4 °C (4.4.3.) rekonstituiert und mit Hind II gespalten. Der Schutz der Spaltstellen durch H1 bzw. H2A wurde, wie in der Legende zu Abb. 6 beschrieben, bestimmt.

plexe, die ohne Harnstoff durch Dialyse einer Mischung der Komponenten in 2 M NaCl gegen Tris, EDTA-Puffer gebildet wurden, einen deutlichen präferentiellen Schutz der beiden linken Hind II-Spaltstellen (Abb. 8 a), der nahezu verlorenging, wenn die Komplexe im Salz-Harnstoff-Gradienten (4.4.2.) gebildet wurden (Abb. 8 b). Der präferentielle Schutz der linken Spaltstellen trat jedoch nicht mehr auf, wenn die $(H3)_2(H4)_2$ -DNA-Komplexe im Salz-Gradienten ohne Harnstoff, wie unter 4.4.4. beschrieben, rekonstituiert wurden; statt dessen ergab sich ein gleich-

mäßiger Schutz aller fünf Spaltstellen (Abb. 8 c). Daraus folgt, daß die präferentielle Bindung des $(H3)_2(H4)_2$ -Tetramerkomplexes an bestimmte DNA-Sequenzen - neben der An- oder Abwesenheit von Harnstoff während der Rekonstitution - auch von anderen Parametern, die in den verschiedenen Rekonstitutionsprozeduren variiert wurden, abhängig sein muß. Möglicherweise beeinflußt die Ionenstärke während der Spaltung die unterschiedliche Bindung der Histone, da der präferentielle Schutz in $(H3)_2(H4)_2$ -DNA-Komplexen (Abb. 8 a) auch verlorenging, wenn die Komplexe in Gegenwart von 0,1 M NaCl gespalten wurden.

Komplexe, die mit Form I statt Form III der λ dv 21-DNA nach der Salz-Harnstoff-Methode (4.4.2.) rekonstituiert worden waren, zeigten - wie die entsprechenden Komplexe aus linearer λ dv 21-DNA - präferentiellen Schutz der zwei linken Hind II-Spaltstellen durch einzelne Histone (H1 und H2A wurden untersucht), dagegen gleichmäßigen Schutz aller fünf Spaltstellen durch das Gemisch der vier kleinen Histone. Die in diesen Rekonstitutionsversuchen verwendete DNA-Fraktion enthielt zu mindestens 60 % das dimere Molekül als Form I und war frei von linearer DNA.

2.2. Charakterisierung von Histon-DNA-Komplexen mit Hilfe unspezifischer Nukleasen

Um zu prüfen, ob die Rekonstitution von Histon-DNA-Komplexen aus λ dv 21-DNA und einem Gemisch der vier Histone H2A, H2B, H3 und H4 tatsächlich zu Untereinheiten führt, die den Nukleosomen im Chromatin entsprechen, sollen die Komplexe mit unspezifischen Nukleasen abgebaut werden. Die dabei auftretenden DNA-Fragmentmuster sollen mit denjenigen verglichen werden, die durch Abbau von "nativen" Histon-DNA-Komplexen erhalten werden. Zum Abbau sollen insbesondere Mikrokokkus-Nuklease und DNAase I verwendet werden, für die die DNA-Fragmentmuster von Zellkernen und Chromatin gut bekannt sind (18, 55 - 58).

Wie bereits erwähnt, spaltet Mikrokokkus-Nuklease den DNA-Strang bevorzugt im internukleosomalen Bereich, so daß zu Beginn einer Inkubation mit dieser Nuklease eine Reihe von diskreten DNA-Fragmenten entsteht, deren Kettenlängen Vielfache der pro Nukleosom gebundenen DNA-Menge darstellen (18, 55). DNAase I dagegen spaltet, im Unterschied zum Mikrokokkus-Enzym, nicht präferentiell im internukleosomalen Bereich. Diese Nuklease besitzt etwa gleichen Zugang zu einer Reihe von Spaltstellen im Nukleosom, so daß die elektrophoretische Auftrennung der DNA in denaturierenden Gelen zu einer charakteristischen Serie von einzelsträngigen DNA-Fragmenten führt, die sich jeweils um 10 Nukleotide (N) unterscheiden (56). Auch Mikrokokkus-Nuklease kann die DNA an diesen Stellen im Nukleosom spalten. Vollständiger Abbau von Kernen oder Chromatin mit Mikrokokkus-Nuklease - hierbei werden ca. 50 % der DNA säurelöslich - führt zu etwa 11 sog. subnukleosomalen DNA-Fragmenten, die zwischen 40 und 160 Np groß sind (57). Die Analyse der DNA nach extensivem Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease auf denaturierenden Gelen zeigt

eine ähnliche Serie von einzelsträngigen DNA-Fragmenten wie sie nach Abbau mit DNAase I erhalten werden (57).

Im folgenden wird der Abbau der Komplexe mit DNAase I und der extensive Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease zum Muster der subnukleosomalen DNA-Fragmente dazu benutzt, die interne Struktur der Untereinheiten zu untersuchen, soweit sie durch Histon-DNA-Wechselwirkungen bestimmt wird. Kurze Inkubation der Komplexe mit Mikrokokkus-Nuklease dient andererseits dazu, die Kettenlängen der multimeren DNA-Fragmente und daraus den DNA-Gehalt der Untereinheiten zu bestimmen.

2.2.1. Abbau von rekonstituierten Histon- DNA-Komplexen und Zellkernen mit Mikrokokkus-Nuklease und DNAase I -----

Der Abbau von rekonstituierten Histon-DNA-Komplexen mit Mikrokokkus-Nuklease wird zunächst als Methode für die Klassifizierung verschiedener Rekonstitutionsmethoden benutzt. Das Ziel ist, einen Komplex zu rekonstituieren, der nach Abbau zu einem Fragmentmuster führt, das möglichst weitgehend dem Muster ähnelt, das durch Abbau von Rattenleberzellkernen mit Mikrokokkus-Nuklease erhalten wird. Die Fragmentmuster werden dabei nach den folgenden drei Kriterien beurteilt: nach der Menge der DNA in diskreten Banden, der Kettenlänge der diskreten DNA-Fragmente und daraufhin, ob die diskreten DNA-Fragmente ganzzahlige Vielfache einer Einheitslänge sind.

Abb. 13 zeigt die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten, die nach Abbau von rekonstituierten Komplexen mit Mikrokokkus-Nuklease erhalten wurden, im Vergleich zu solchen von Rattenleberzellkernen. Die Komplexe

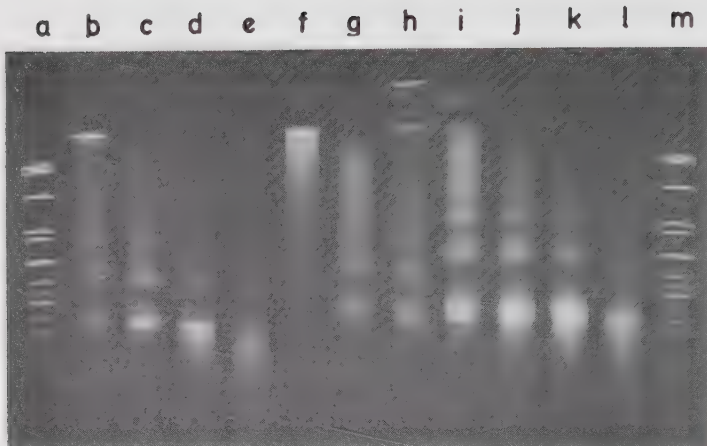


Abb. 13 Abbau von rekonstituierten Komplexen und Rattenleberzellkernen durch Mikrokokkus-Nuklease

Der aus λ dv 21-DNA (Form I) und einem Gemisch der vier kleinen Histone (Histon/DNA-Verhältnis 1,25 mg/mg) im Salz-Gradienten ohne Harnstoff (4.4.4.) rekonstituierte Komplex wurde bei 37 °C mit 2 U/ml Mikrokokkus-Nuklease 15 Sek., 1, 5 und 30 Min. (b - e) bzw. bei 0 °C mit 80 U/ml 30 Sek., 5 und 30 Min. (f - h) inkubiert. Rattenleberzellkerne, die von W. Pfeiffer nach Ref. 17 präpariert und zur Verfügung gestellt wurden, wurden analog zu Ref. 18, jedoch in 3 mM CaCl_2 , bei 37 °C mit 20 U/ml Mikrokokkus-Nuklease 2, 5, und 60 Min. (i - l) abgebaut. Je 0,1 A₂₆₀-Einheiten DNA wurden in einem 6 %igen Acrylamid-Plattengel mit 4 %igen Sammelgel nach Ref. 59 analysiert. Zum Größenvergleich der DNA-Fragmente wurden in a und m λ dv 1-Bsu-Fragmente aufgetragen.

wurden aus einem Gemisch der vier Kalbsthymushistone H2A, H2B, H3 und H4 und der dimeren λ dv 21-DNA (Form I) durch Dialyse gegen Salzlösungen abnehmender Konzentration ohne Harnstoff rekonstituiert (4.4.4.). Die so dargestellten Komplexe ergaben nach Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease den höchsten Anteil von DNA in einer Reihe von diskreten Banden. Andere Rekonstitutionsmethoden (z.B. 4.4.2.)

führten zu Komplexen, die nach Abbau einen höheren "Untergrund" längenheterogener DNA-Fragmente ergaben. Ein Vergleich der verschiedenen Methoden läßt den Schluß zu, daß es für die Rekonstitution gleichmäßig dicht aneinandergereihter Untereinheiten von Vorteil ist, ohne Harnstoff zu arbeiten, entgegen den allgemein gebräuchlichen Methoden. Zu dem gleichen Schluß kamen andere Autoren aufgrund von Röntgenbeugungsstudien (60) und Abbau rekonstituierter Komplexe mit Mikrokokkus-Nuklease und DNAase I (61).

Von Bedeutung war außerdem die Rekonstitutionstemperatur: Rekonstitution bei 4 °C in 4 Tagen (4.4.3.) statt bei 37 °C in 8 Std. ergab einen geringeren Anteil von DNA in diskreten Banden. Die Fragmentmuster wurden jedoch ähnlich denen in Abb. 13, wenn die Komplexe bei 4 °C rekonstituiert und vor dem Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease 30 bis 60 Min. bei 37 °C inkubiert wurden.

Auch das Histon/DNA-Verhältnis der Komplexe hatte einen Einfluß auf die Bandenmuster, die nach Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease erhalten wurden. Den höchsten Anteil von DNA in einer Reihe von diskreten Banden ergaben Komplexe mit einem Histon/DNA-Gewichtsverhältnis von 1,25 - 1,5 mg/mg, während bei Verhältnissen von 0,4 - 0,8 mg/mg im wesentlichen nur DNA-Fragmente im Monomerbereich (siehe unten) und bei Verhältnissen von 2,0 - 3,0 mg/mg ein sehr viel höherer "Untergrund" längenheterogener DNA-Fragmente gefunden wurde.

Ohne Einfluß war die Herkunft der DNA, die in der Rekonstitution verwendet wurde. Die homologe eukaryontische Kalbsthymus-DNA gab ähnliche Ergebnisse wie die prokaryontischen T7- bzw. λ dv 21-DNAs. Die Rekonstitution der Untereinheiten konnte sowohl mit salzextrahierten Histonkomplexen $[(H2A, H2B)$ und $(H3)_2(H4)_2]$ als auch mit einzel-

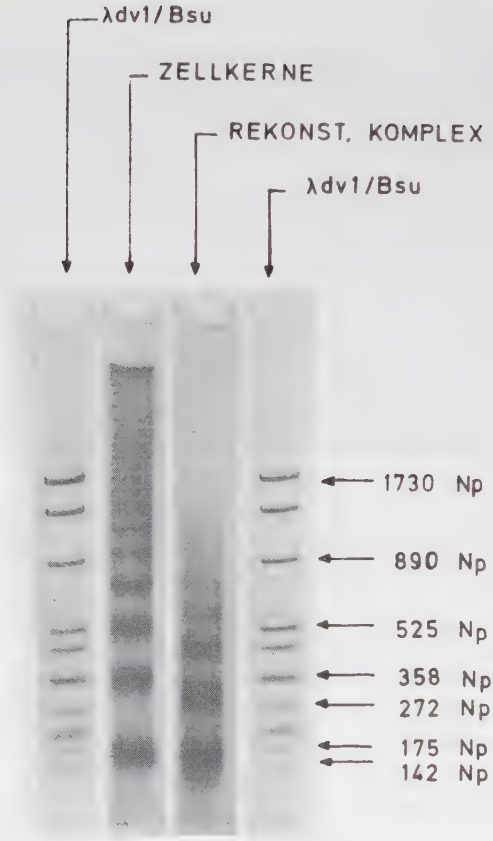


Abb. 14 Abbau von Kalbsthymuszellkernen und rekonstituiertem Komplex durch Mikrokoccus-Nuklease

Kalbsthymuszellkerne wurden in Puffer A (4.3.1.), 0,2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM CaCl_2 in einer Konzentration von 20 A₂₆₀-Einheiten/ml mit 20 U/ml Mikrokoccus-Nuklease 10 Min. bei 37 °C abgebaut. Der analog zu Abb. 13 rekonstituierte Komplex wurde in Puffer A, 1 mM PMSF, 0,3 mM CaCl_2 in einer Konzentration von 1 A₂₆₀-Einheiten/ml mit 3 U/ml Mikrokoccus-Nuklease 5 Min. bei 37 °C inkubiert. Je 0,1 A₂₆₀-Einheiten wurden in einem 2 %igen Agarose-Plattengel in TEP-Puffer ohne Äthidiumbromid analysiert.

nen Histonfraktionen vorgenommen werden. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Histon-DNA-Komplexe aus Histonkomplexen und λ dv 21-DNA im Histon/DNA-Gewichtsverhältnis von 1,25 mg/mg rekonstituiert.

Wie aus Abb. 13 ersichtlich, führte der Abbau rekonstituierter Komplexe mit Mikrokokkus-Nuklease bei 37 °C und bei 0 °C, wie der von Rattenleberzellkernen, im Laufe der Inkubation zu einer Zunahme der kleineren, diskreten DNA-Fragmente auf Kosten der größeren, diskreten Fragmente. Einen auffälligen Unterschied zwischen rekonstituierten Komplexen und Zellkernen ergab jedoch der Größenvergleich der DNA-Fragmente. Abb. 13 und 14 zeigen, daß die DNA-Fragmente nach Abbau des rekonstituierten Komplexes in der Elektrophorese deutlich schneller laufen, also kleiner sind als die von Rattenleber- bzw. Kalbsthymuszellkernen. Ein entsprechender Vergleich zeigte, daß die DNA-Fragmente nach Abbau von Rattenleberzellkernen gleich groß sind wie die von Kalbsthymuszellkernen. Durch Ko-elektrophorese mit λ dv 1-Bsu-Restriktionsfragmenten wurden über eine Eichkurve, wie in Abb. 15 für den rekonstituierten Komplex gezeigt, die Molekulargewichte der unbekannten DNA-Fragmente bestimmt (Tab. 2). Abb. 16 zeigt, daß die Kettenlängen der DNA-Fragmente des rekonstituierten Komplexes, ebenso wie die der aus Kalbsthymuszellkernen entstandenen Fragmente Vielfache einer Einheit sind. Während sich jedoch für die Zellkerne aus den Differenzen der Kettenlängen aufeinanderfolgender Fragmente ein Wert von 195 ± 4 Np DNA pro Nukleosom errechnet, findet man im rekonstituierten Komplex nur 137 ± 7 Np DNA pro Untereinheit. Aufgrund der Exonuklease-Aktivität der Mikrokokkus-Nuklease ist es sinnvoll, die Einheitslänge der DNA-Fragmente aus den Differenzen der Kettenlängen aufeinanderfolgender DNA-Fragmente zu bestimmen (62).

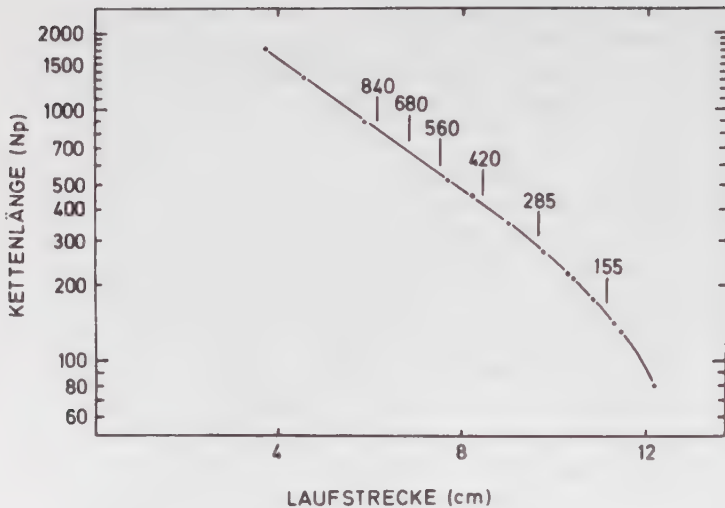


Abb. 15 Bestimmung der Kettenlängen der DNA-Fragmente nach Abbau des rekonstituierten Komplexes mit Mikrokokkus-Nuklease

Nach Abbau des rekonstituierten Komplexes wurden die DNA-Fragmente mit λ dv 1-Bsu-Fragmenten gemischt und entsprechend Abb. 14 elektrophoretisch aufgetrennt, gefärbt und fotografiert. Die Negative wurden densitometriert und die Laufstrecke der Fragmente vom Startpunkt bis zum Zentrum der Bande gemessen. Zur Konstruktion der Eichkurve wurden die Kettenlängen der zugemischten λ dv 1-Bsu-Fragmente benutzt (vgl. 4.8.). Punkte: λ dv 1-Bsu-Fragmente, vertikale Linien: DNA-Fragmente nach Abbau des rekonstituierten Komplexes

Komplexe, die aus DNA (Kalbsthymus-DNA oder Form I der λ dv 21-DNA) und (H2A, H2B) oder (H3)₂(H4)₂ allein im Salz-Gradienten ohne Harnstoff bei 37 °C (4.4.4.) rekonstituiert wurden, ergaben beim Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease kein Muster multimerer DNA-Fragmente. Das be-

Bande ^a	Kalbsthymus-					Rekonst. ^b Komplex
	Kerne ^b	Chromatin ^c	H1-freies Chromatin			
			30 Sek. ^{c,d}	1 Min. ^c	3 Min. ^e	
1	168	168	170	178	150	155
2	365	365	365 (335)	320	285	285
3	550	550	580 (470)	465	420	420
4	750	750	750	570	540	560
5	960	950	970	720	680	680
6	1170	1140	1130	860		840
7	1360	1340				
8	1550	1500				
9	1730	1700				

Länge der Einheit^f

195±4	192±5	192±12	136±8	134±5	137±7
-------	-------	--------	-------	-------	-------

Tab. 2 Größen der DNA-Fragmente nach Abbau mit
Mikrokokkus-Nuklease (Nukleotidpaare)^a

- a Nach Elektrophorese in Agarosegel. Alle Fragmentgrößen wurden durch Koelektrophorese mit λ dv 1-Bsu-Fragmenten bestimmt wie in Abb. 15 gezeigt.
- b Kettenlängen der DNA-Fragmente in Abb. 14
- c Kettenlängen der DNA-Fragmente in Abb. 22
- d Die Kettenlängen der DNA-Fragmente, die in Abb. 22 als "Schultern" von Bande 2 und 3 zu erkennen sind, sind in Klammern angegeben. Sie wurden zur Berechnung der Einheitslänge nicht berücksichtigt.
- e Kettenlängen der DNA-Fragmente in Abb. 25
- f Die Länge der Einheit wurde aus den Differenzen der Kettenlängen aufeinanderfolgender DNA-Fragmente berechnet (Ref. 62) und der Fehler nach der Methode der kleinsten Quadrate ermittelt.

deutet, daß alle vier Histone nötig sind, um aneinander-
gereichte Untereinheiten zu rekonstituieren.

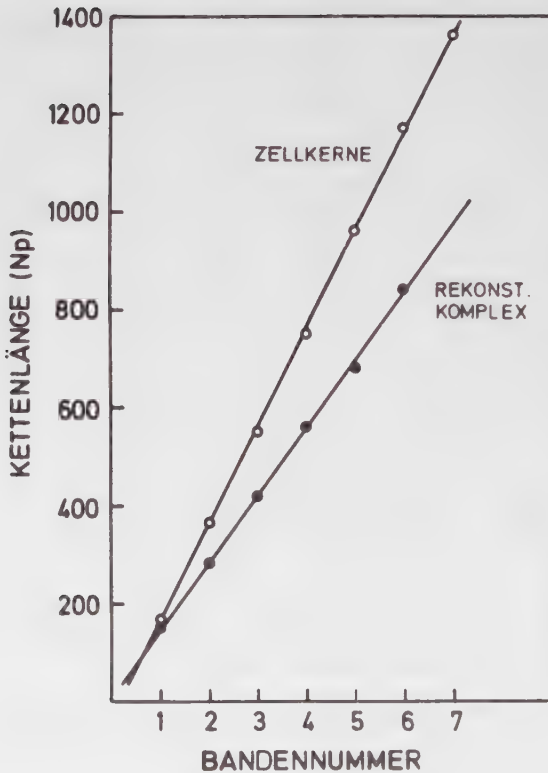


Abb. 16 Vergleich der Einheitslängen der DNA-Fragmente aus Kalbsthymuszellkernen und rekonstituiertem Komplex

Kalbsthymuszellkerne bzw. rekonstituierter Komplex wurden, wie in der Legende zu Abb. 14 beschrieben, mit Mikrokokkus-Nuklease abgebaut und die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Die Kettenlängen der DNA-Fragmente wurden, wie in Abb. 15 gezeigt, ermittelt und in Abhängigkeit von der Bandennummer (zurückgezählt von der am schnellsten wandernden Bande) aufgetragen.

Die mit einem Gemisch der vier kleinen Histone rekonstituierten Komplexe wurden freundlicherweise von P. Oudet



Abb. 17 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines aus λ dv 21-DNA und einem Gemisch der vier Histone H2A, H2B, H3 und H4 rekonstituierten Komplexes

Der Komplex mit einem Histon/DNA-Verhältnis von 1,25 mg/mg wurde im Salz-Gradienten ohne Harnstoff, wie unter 4.4.4. beschrieben, rekonstituiert. Anschließend wurde 1 Std. gegen 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 mM EDTA dialysiert und die Probe im gleichen Puffer auf eine Konzentration von 0,3 μ g/ml verdünnt. Die elektronenmikroskopische Aufnahme wurde von P. Oudet (Institut de Chimie Biologique, Straßburg) angefertigt (vgl. Ref. 15).

(Institut de Chimie Biologique, Straßburg) zusätzlich im Elektronenmikroskop untersucht. In Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Befunden (Mikrokokkus-Nuklease-Abbau) zeigten Komplexe mit einem Histon/DNA-Gewichtsverhältnis von 0,4 mg/mg etwa 5 - 9 diskrete Partikel mit den Dimensionen eines Nukleosoms pro DNA-Molekül, während Komplexe mit einem Gewichtsverhältnis von 1,25 mg Histon/mg DNA sehr viel mehr Partikel pro DNA-Molekül besaßen, die teilweise sehr dicht aneinander gepackt waren (Abb. 17).

In beiden Fällen wurden außerdem einige wenige völlig histonfreie DNA-Moleküle gefunden.

Aufgrund von elektronenmikroskopischen Messungen wurde von P. Oudet et al. (15) ein DNA-Gehalt von ca. 200 Np statt der hier gefundenen 140 Np pro rekonstituiertes Partikel angegeben. Komplexe, die nach der dort angegebenen Methode rekonstituiert worden waren, wurden jedoch ebenfalls durch Mikrokokkus-Nuklease zu DNA-Fragmenten abgebaut, deren Kettenlängen Vielfache der kleineren Einheitslänge von ca. 140 Np waren.

Es ist auffällig, daß die DNA-Fragmente im Monomerbereich, die zu Beginn der Inkubation mit Mikrokokkus-Nuklease von rekonstituierten Komplexen entstanden, mit 155 Np größer sind als sie aufgrund der Einheitslänge von ca. 140 Np sein sollten (Abb. 13 a, f - h und Tab. 2). Die breite Bande im Monomerbereich, die zunächst erhalten wurde, wurde jedoch im Laufe der Inkubation in eine scharfe Bande überführt, die an der Front der breiten Bande lief (Abb. 13 c und d). Über Koelektrophorese mit zugemischten λ dv 1-Bsu-Fragmenten in 2,5 %igen Agarosegelen ergab sich für die Größe dieses DNA-Fragments ein Wert von ca. 142 Np. Dieses Fragment entspricht demnach aufgrund seiner Länge, die innerhalb der Fehlergrenzen mit der Größe der Einheitslänge übereinstimmt, dem gesuchten Monomerfragment. Die elektronenmikroskopische Aufnahme des rekonstituierten Komplexes (Abb. 17) zeigt, daß nicht alle Partikel dicht aneinandergereiht, sondern ein Teil der Untereinheiten durch histonfreie DNA-Stränge voneinander getrennt sind. Es ist sehr wahrscheinlich, daß solche relativ zugänglichen Stellen der DNA bevorzugt von der Nuklease angegriffen und so zunächst Komplexe herausgespalten werden, die neben den ca. 140 Np DNA pro Untereinheit noch zusätzlich histonfreie DNA-Enden besitzen, die erst im weiteren Verlauf der Inkubation abgebaut werden.

Trotz des unterschiedlichen DNA-Gehalts der Untereinheiten im rekonstituierten Komplex einerseits und den Nukleosomen im Zellkern andererseits, führte der Abbau rekonstituierter Komplexe mit DNAase I zu der gleichen Serie einzelsträngiger DNA-Fragmente wie sie von Kalbsthymuszellkernen erhalten wurden (Abb. 18). Das bedeutet, daß die interne Struktur der Nukleosomen, die diesem Spaltungsmuster zugrunde liegt, auch in den Untereinheiten des rekonstituierten Komplexes vorlag. Die mit Adv 21- statt mit Kalbsthymus-DNA rekonstituierten Komplexe ergaben ein entsprechendes Fragmentmuster. Die DNA-Fragmente mit einer Länge von 40, 80 und 120 N wurden durch Koelektrophorese mit sequenzierten RNAs identifiziert (5 S-RNA aus Hefe mit 120 N, tRNA^{Phe} aus Hefe mit 76 N und tRNA^{Phe}-Fragmente mit 38 und 36 N). Sowohl die Größen der DNA-Fragmente als auch die unterschiedlichen Intensitätsverhältnisse der Banden zueinander stimmen mit den Ergebnissen der DNAase I-Verdauung von Rattenleberzellkernen (56) überein.

Extensiver Abbau des rekonstituierten Komplexes mit Mikrokokkus-Nuklease führte ebenfalls zu dem Schluß, daß die Anordnung der DNA in den rekonstituierten Untereinheiten der Anordnung der DNA in den Nukleosomen entsprach, die zu den charakteristischen intranukleosomalen Spaltstellen führt. Abb. 13 zeigt, daß ähnliche Muster subnukleosomaler Fragmente von Rattenleberzellkernen und vom rekonstituierten Komplex erhalten wurden. Weitgehender Abbau von Kalbsthymuszellkernen führte ebenfalls zu diesen DNA-Fragmenten. Die Kettenlängen der subnukleosomalen DNA-Fragmente, die in diesem Gelsystem aufgelöst werden konnten, betrugen ca. 70, 90, 108, 130 und 142 Np. Eine Variation des Histon/DNA-Verhältnisses (0,9 und 1,5 mg Histon/mg DNA) hatte keinen Einfluß auf die beobachteten Muster und die Größen der DNA-Fragmente.

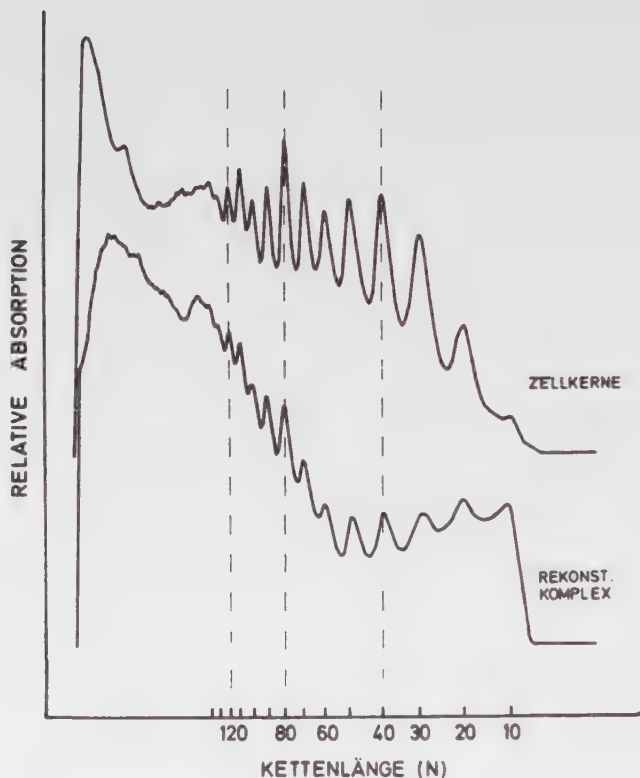


Abb. 18 Rekonstituierte Komplexe aus DNA und den vier kleinen Histonen werden durch DNAase I ähnlich wie Zellkerne abgebaut

Kalbsthymuszellkerne wurden in Puffer A (4.3.1.), 0,2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM $MgCl_2$ in einer Konzentration von 20 A₂₆₀-Einheiten/ml mit 150 U/ml DNAase I abgebaut. Der aus Kalbsthymus-DNA und den vier Histonen ohne Harnstoff (4.4.4.) rekonstituierte Komplex wurde unter Zusatz von 10 mM $MgCl_2$ mit 30 U/ml DNAase I 1,5 Min. bei 37 °C inkubiert. Je 0,3 A₂₆₀-Einheiten DNA wurden in 40 µl 10 M Harnstoff, 0,2 x TEB-Puffer 30 Sek. auf 100 °C erhitzt und nach Ref. 63 in einem 6 %igen Polyacrylamid-Plattengel, das 6 M Harnstoff enthielt, elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung mit Äthidumbromid wurde das Gel fotografiert; die Negative wurden densitometriert.

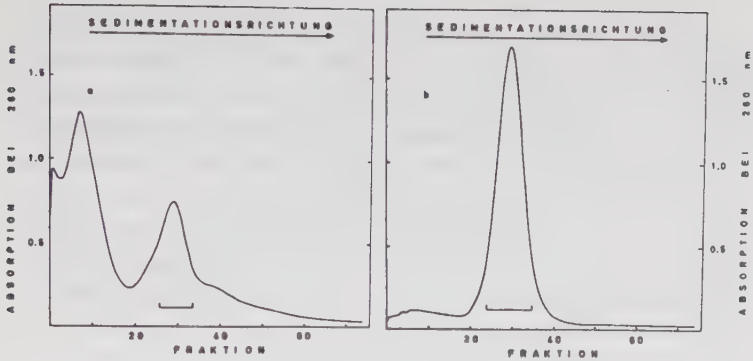


Abb. 19 Sedimentationsverhalten der rekonstituierten Untereinheit im Saccharose-Gradienten

a, Komplexe wurden aus Kalbsthymus-DNA und einem Gemisch der vier kleinen Histone (Histon/DNA-Verhältnis 0,9 mg/mg), wie unter 4.9. beschrieben, rekonstituiert, mit Mikrokokus-Nuklease partiell abgebaut und im Saccharose-Gradienten fraktioniert. b, 8 A₂₆₀-Einheiten der so isolierten Untereinheit wurden in einem zweiten Saccharose-Gradienten unter gleichen Bedingungen rezentrifugiert.

Um zu zeigen, daß sich die rekonstituierte Untereinheit auch als diskreter Komplex in Lösung isolieren läßt, wurde ein Komplex aus Kalbsthymus-DNA und den vier kleinen Histonen mit Mikrokokus-Nuklease abgebaut und im Saccharose-Gradienten, wie unter 4.9. beschrieben, fraktioniert (Abb. 19 a). Fraktionen, die aufgrund der Länge der DNA diskrete Untereinheiten enthielten, wurden rezentrifugiert. Abb. 19 b zeigt, daß die rekonstituierten Untereinheiten als homogene Fraktion sedimentierten. Die Sedimentationskonstante der rekonstituierten Untereinheit wurde in der analytischen Ultrazentrifuge, wie unter 4.10. angegeben, bestimmt. Es ergab sich ein Wert von 11,6 S ($S_{20,W}$). Nach dem Abbau des Histon-DNA-Komplexes mit Mikrokokus-Nuklease ließen sich ca. 10 % der A₂₆₀-Einheiten

als diskrete Untereinheiten isolieren. Diese Ausbeute entspricht etwa derjenigen, die bei der Isolierung diskreter Untereinheiten aus Chromatin erzielt wurde (64). Die rekonstituierten Untereinheiten enthielten aufgrund einer SDS-Gelelektrophorese alle vier kleinen Histone in etwa äquimolaren Mengen. Die Länge der DNA in den Untereinheiten betrug ca. 145 Np, in Übereinstimmung mit der Einheitslänge, die aufgrund der Kettenlängendifferenzen diskreter DNA-Fragmente nach partiellem Mikrokokkus-Nuklease-Abbau ermittelt wurde (Tab. 2). Unter denaturierenden Bedingungen ergab sich im wesentlichen eine Bande, die einem DNA-Fragment mit der Länge von ca. 140 N entsprach. Zusätzlich wurde unter denaturierenden und unter nicht-denaturierenden Bedingungen ein diskretes DNA-Fragment (etwa 10 % des anfärbbaren Materials) mit einer Länge von ca. 100 N bzw. 105 Np gefunden, das wahrscheinlich durch Spaltung der DNA innerhalb der Untereinheit entstanden war. Inkubation der isolierten Untereinheit mit DNAase I führte zu der gleichen Serie einzelsträngiger DNA-Fragmente wie sie durch Abbau von Zellkernen und dem rekonstituierten Komplex vor der Fraktionierung erhalten wurden.

2.2.2. Abbau von H1-freiem Chromatin mit Mikrokokkus-Nuklease und DNAase I

Da die Rekonstitution von Histon-DNA-Komplexen mit den vier Histonen H2A, H2B, H3 und H4 ohne H1 zu dicht aneinandergereihten Untereinheiten im Raster von ca. 140 Np DNA geführt hatte, stellte sich die Frage, ob auch Chromatin durch Entfernung von H1 vom 200 Np-Raster der Nukleosomen in ein 140 Np-Raster überführt werden kann.

Zunächst wurde Kalbsthymuschromatin, wie unter 4.3.2. beschrieben, mit einem Molekulargewicht der DNA zwischen 3.000 und 30.000 nach einer Methode präpariert, die die native Struktur des Chromatins nicht zerstören soll (55), und mit Mikrokokkus-Nuklease (Abb. 22 a) und DNAase I (Abb. 23) auf seine Struktur hin untersucht. Wie erwartet, zeigen die DNA-Fragmentmuster keinen Unterschied zu denen intakter Kalbsthymuskerne. Die pro Nukleosom gebundene DNA-Menge betrug 192 ± 5 Np (Tab. 2), was gut mit dem für Kerne gefundenen Wert von 195 ± 4 Np übereinstimmt. Die Analyse der Proteine im Chromatin im SDS-Gel zeigt die Anwesenheit aller fünf Histone, Nichthistonproteine wurden nicht gefunden (Abb. 20).

Aus dem Chromatin wurde H1 mit 0,63 M NaCl extrahiert (Abb. 20). Von dieser Methode wird berichtet, daß sie die im Elektronenmikroskop zu beobachtende Nukleosomenstruktur nicht zerstört (15). Der Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease ergab jedoch auffällige Unterschiede zwischen Chromatin und H1-freiem Chromatin. Wie in Abb. 21 zu erkennen ist, entstand während der Inkubation des H1-freien Chromatins zunächst (30 Sek.-Wert) eine Serie von DNA-Fragmenten ähnlich der von Kalbsthymuszellkernen und Chromatin. Abbau des H1-freien Chromatins unter diesen Bedingungen führte jedoch gleichzeitig zu deutlich erhöhten Mengen an längenheterogenen DNA-Fragmenten und zu je einer schwachen Bande neben der Dimer- und Trimer-Bande, die im entsprechenden Densitogramm in Abb. 22 b als Schultern zu erkennen sind. Diese Banden wurden im Laufe der Inkubation (1 Min.: Abb. 21 und Abb. 22 c, 3 Min.: Abb. 25) schärfer und intensiver, während die ursprünglichen Dimer- und Trimer-Banden verschwanden. Der Vergleich der Densitogramme in Abb. 22 läßt erkennen, daß zu diesem Zeitpunkt das Muster der DNA-Fragmente nicht mehr dem der Kalbsthymuszellkerne bzw. dem des

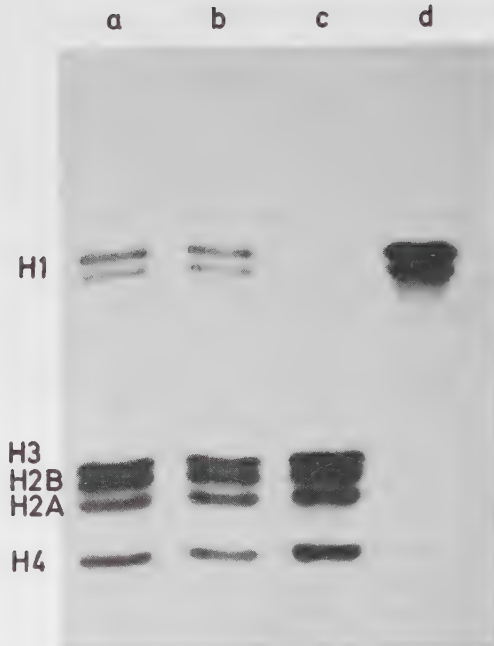


Abb. 20 Elektrophoretische Auftrennung von Kalbsthymus-histonen

a, Chromatin (0,3 A₂₆₀-Einheiten), b, Chromatin mit re-assoziiertem H1 (0,3 A₂₆₀-Einheiten), c, H1-freies Chromatin (0,5 A₂₆₀-Einheiten) und d, H1 (4,4 μ g). Die Proben wurden lyophilisiert, in 40 μ l 0,063 M Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 10 % Glycerin, 5 % β -Mercaptoäthanol, 0,005 % Bromphenolblau 2 Std. bei 45 °C gelöst, im SDS-Gel (65) elektrophoretisch aufgetrennt und die Histone mit Coomassie-Brilliantblau G 250 gefärbt.

Chromatins entsprach, sondern sehr ähnlich war der Serie von Fragmenten, die beim Abbau des rekonstituierten Komplexes entstanden. Die Einheitslängen der DNA-Fragmente im H1-freien Chromatin betrugen 192 ± 12 Np für die Serie diskreter Fragmente nach 30 Sek. Abbau und 136 ± 8 bzw. 134 ± 5 Np für die nach 1 Min. bzw. 3 Min. Abbau (Tab. 2).

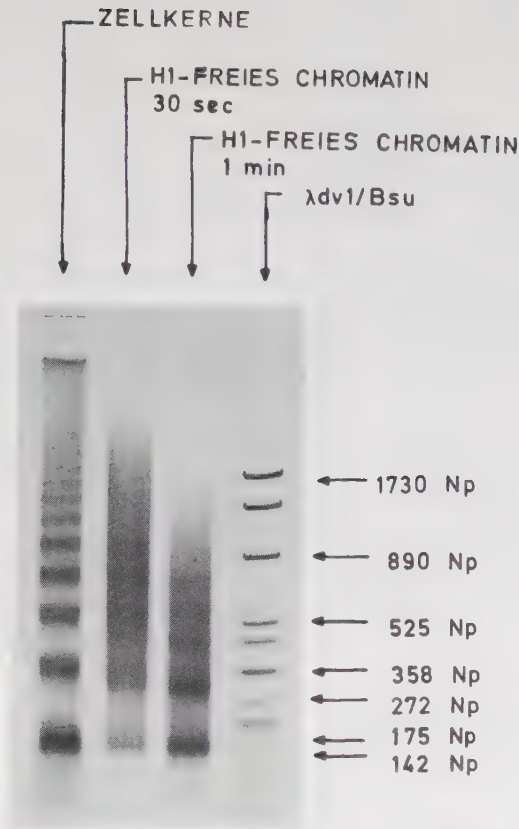


Abb. 21 H1-freies Chromatin wird im Vergleich zu Kalbs-thymuszellkernen durch Mikrokokkus-Nuklease zu einer Serie von DNA-Fragmenten mit kleinerer Einheitslänge abgebaut

H1-freies Chromatin wurde in 5 mM Tris-Acetat, pH 7,8, 20 mM Ammoniumacetat, 0,4 mM CaCl_2 in einer Konzentration von 0,6 A₂₆₀-Einheiten/ml mit 1 U/ml Mikrokokkus-Nuklease 30 Sek. und 1 Min. bei 37 °C inkubiert. Je 0,1 A₂₆₀-Einheiten DNA wurden in einem 2 %igen Agarose-Plattengel analysiert.

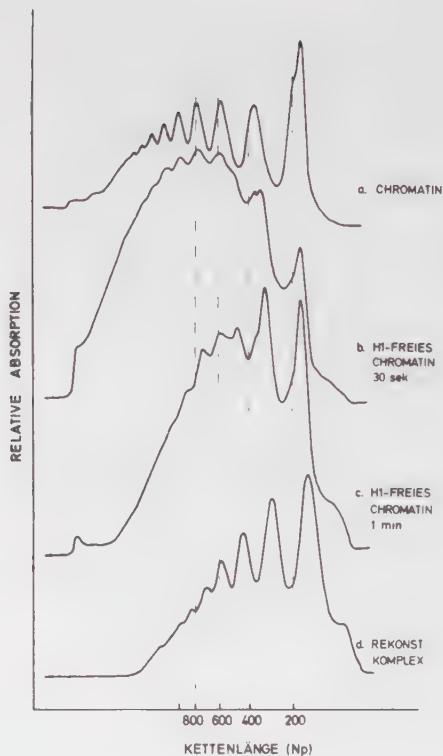


Abb. 22 H1-freies Chromatin führt beim Abbau mit Mikrokokus-Nuklease zunächst zu einer Serie von DNA-Fragmenten ähnlich der von Chromatin, später zu einer Serie ähnlich der vom rekonstituierten Komplex

a, Chromatin wurde analog zu H1-freiem Chromatin (s. Legende zu Abb. 21) inkubiert. b, H1-freies Chromatin wurde 30 Sek. und c, H1-freies Chromatin wurde 1 Min. mit Mikrokokus-Nuklease abgebaut (s. Legende zu Abb. 21). d, Rekonstituierter Komplex (s. Legende zu Abb. 14). In der Abbildung werden die Densitogramme der gelelektrophoretischen Auftrennungen der DNA-Fragmente gezeigt.

Diese Werte stimmen gut überein mit den Größen der Einheitslängen, die im Chromatin und im rekonstituierten Komplex gefunden wurden (Tab. 2).

Zusätzlich zu den Fragmenten, deren Kettenlängen ganzzahlige Vielfache der Einheitslänge von ca. 140 Np waren, traten nach längerem Abbau des H1-freien Chromatins (3 Min. unter den angegebenen Bedingungen) relativ schwach diskrete DNA-Fragmente auf, deren Kettenlängen keine Vielfache von 140 Np waren (Abb. 25). Es ist anzunehmen, daß diese DNA-Fragmente durch Spaltung der DNA innerhalb der Untereinheiten entstanden waren.

Im Unterschied zu Mikrokokkus-Nuklease spaltete DNAase I die DNA im H1-freien Chromatin ebenso wie im Chromatin im Abstand von 10 Nukleotiden (Abb. 23). Das Densitogramm der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente nach Abbau des H1-freien Chromatins zeigt, daß eine Serie von DNA-Fragmenten entstand, die bis zu einer Länge von 250 Nukleotiden aufgelöst wurden.

2.2.3. Einfluß von H1 auf den Abbau rekonstituierter Komplexe

Die bisher geschilderten Versuche zeigen, daß Rekonstitution von Histon-DNA-Komplexen unter Verwendung der vier Kalbsthymushistone ohne H1 zu Untereinheiten mit einem DNA-Gehalt von ca. 140 Np führt, die ebenfalls durch Entfernung von H1 aus "nativem" Chromatin mit 0,63 M NaCl erhalten werden können. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß H1 im Nukleosom verantwortlich ist für die Bindung von 60 Np zusätzlich zu den 140 Np, die durch den Komplex der vier kleinen Histone gebunden werden. Deshalb stellt sich die Frage, ob es unter Zusatz

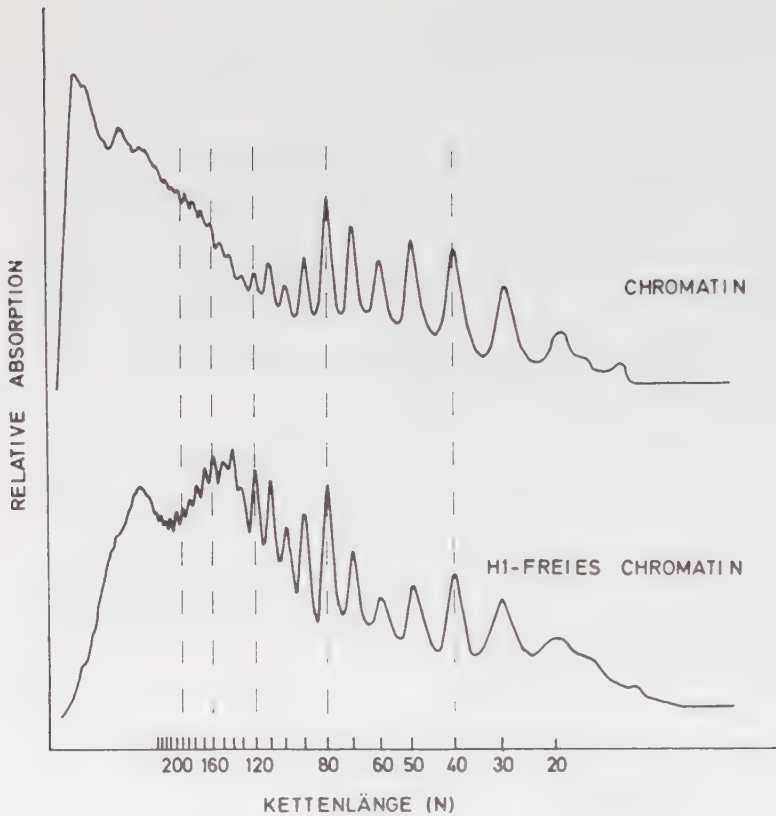


Abb. 23 H1-freies Chromatin wird durch DNAase I ähnlich wie Chromatin abgebaut

Chromatin bzw. H1-freies Chromatin wurde nach Zusatz von 10 mM $MgCl_2$ mit 30 U/ml DNAase I bei 37 °C 5 Min. bzw. 1,5 Min. inkubiert und analog, wie in der Legende zu Abb. 18 beschrieben, analysiert.

von H1 möglich ist, Nukleosomen mit einem DNA-Gehalt von ca. 200 Np zu rekonstituieren.

Wurden Komplexe aus DNA und allen fünf Histonen rekonstituiert und anschließend mit Mikrokokkus-Nuklease gespalten, so beobachtete man zwei Veränderungen gegenüber Komplexen, die nur aus DNA und den vier kleinen Histonen ohne H1 rekonstituiert worden waren. Eine wesentliche Erhöhung des "Untergrundes" an längenheterogenen DNA-Fragmenten und eine zusätzliche Bande von 175 Np im Monomerebereich (siehe unten). In keinem Fall fanden sich jedoch diskrete DNA-Fragmente, die Vielfache einer Einheitslänge von 200 Np waren.

Eine Reihe von Parametern wurden in den Rekonstitutionsversuchen mit allen fünf Histonen variiert. Unter Verwendung verschiedener DNAs (λ dv 21-DNA Form I und III, T7-DNA, Kalbsthymus-DNA) wurde die Rekonstitution im NaCl-Gradienten in An- oder Abwesenheit von 5 M Harnstoff, mit verschiedenen Rekonstitutionspuffern (Phosphat, Tris, Borat im pH-Bereich 5,5 - 9,0) und bei verschiedenen Temperaturen (4 ° und 37 °C) untersucht. Weiterhin wurden die Konzentrationen der Histone und der DNA sowie das H1/DNA-Verhältnis (bis zu 2 Molekülen H1/200 Np DNA) variiert und die Dialysezeiten auf den Salzstufen ausgedehnt, die kritisch für die Assoziation des Histons H1 an die DNA sind (0,6 - 0,4 M NaCl). Auch die Rekonstitution zunächst ohne H1 und Zugabe von H1 erst in 0,6 M NaCl führte ebensowenig zum 200 Np-Raster wie die langsame Dialyse der Histone allein (mit und ohne H1) von 0 M auf 2 M NaCl und anschließende Rekonstitution nach Zugabe der DNA.

Die Anwesenheit von H1 im Rekonstitutionsansatz führte jedoch beim Abbau der Komplexe mit Mikrokokkus-Nuklease außer zu den bisher beschriebenen subnukleosomalen DNA-

Fragmenten zu einer neuen relativ scharfen und stabilen Bande. Während nach Abbau von Komplexen, die aus DNA und den vier kleinen Histonen ohne H1 rekonstituiert worden waren (0,9 - 1,5 mg Histon/mg DNA), nur eine relativ breite, schwache Bande unterschiedlich großer DNA-Fragmente oberhalb des Monomer-Fragments von ca. 140 Np beobachtet wurde (Abb. 13 und 24 b - e), fand man nach Abbau von Komplexen aus DNA und allen fünf Histonen an dieser Stelle ein stabiles DNA-Fragment von ca. 175 Np (Abb. 24 g - i). Zusatz von 0,1 - 0,3 μ g H1 zu insgesamt 0,9 - 1,0 μ g der vier kleinen Histone pro μ g DNA im Rekonstitutionsansatz führte beim Abbau durch Mikrokokkus-Nuklease zu dieser Bande.

Die Beobachtung, daß rekonstituierte Komplexe mit allen fünf Histonen bei extensiver Verdauung mit Mikrokokkus-Nuklease ein zusätzliches, stabiles DNA-Fragment ergeben, wurde auch von anderen Autoren gemacht (57). Es wurde gezeigt, daß dieses Fragment auch beim Abbau von Chromatin auftritt und damit kein Artefakt der Rekonstitution ist (57). Beim Abbau der Rattenleberzellkerne (Abb. 13) unter den in der Legende angegebenen Bedingungen war an dieser Stelle nur eine breite Bande zu erkennen, deren scharfe Front einem DNA-Fragment von ca. 140 Np entsprach. Auch Kalbsthymuszellkerne führten unter den für Rattenleberzellkerne angegebenen Inkubationsbedingungen zu dieser breiten Bande, die nicht aufgelöst werden konnte. Wenn Kalbsthymuskerne jedoch unter den gleichen Bedingungen wie rekonstituierte Komplexe abgebaut wurden, wurde ähnlich wie dort eine relativ scharfe und stabile Bande gefunden, die einem DNA-Fragment von ca. 170 Np entsprach.

Da auch von rekonstituierten Komplexen mit allen fünf Histonen nach Verdauung nur multimere DNA-Fragmente erhalten wurden, aus deren Kettenlängendifferenzen sich

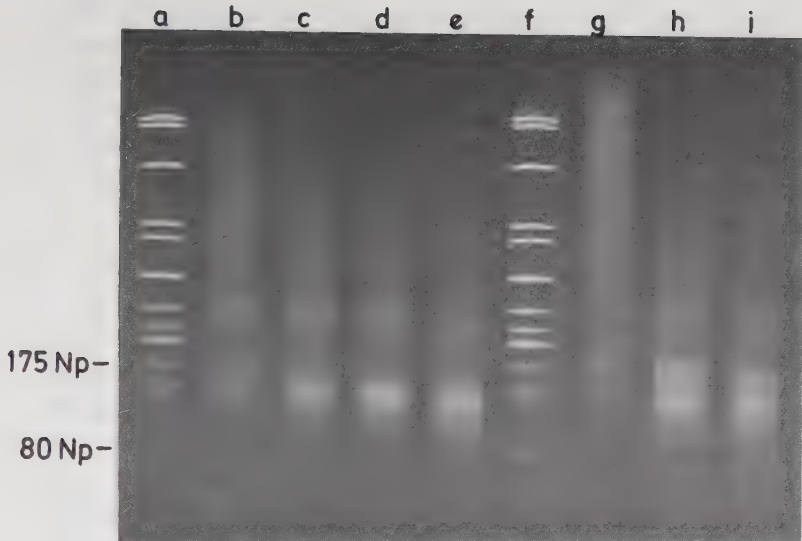


Abb. 24 Bindung von H1 in Komplexen aus DNA und allen fünf Histonen bewirkt den stabilen Schutz eines DNA-Fragmentes von ca. 175 Np

Komplexe wurden aus λ dv 21-DNA und einem Gemisch der vier kleinen Histone (Komplexe ohne H1) im Histon/DNA-Gewichtsverhältnis von 1,5 bzw. mit einem Gemisch aller fünf Histone (Komplexe mit H1) im Gewichtsverhältnis von H1 : H2A + H2B : H3 + H4 : DNA = 0,1 : 0,5 : 0,5 : 1 im Salz-Gradienten (4.4.3.) rekonstituiert. Nach 50 Min. Vorinkubation bei 37 °C wurden die Komplexe mit 2 U/ml Mikrokokkus-Nuklease 1, 3, 5 und 10 Min. (Komplexe ohne H1, b - e) bzw. 1, 5 und 30 Min. (Komplexe mit H1, g - i) abgebaut. Die DNA-Fragmente wurden, wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt. Zum Größenvergleich der DNA-Fragmente wurde in a und f das Gemisch der λ dv 1-Bsu-Fragmente aufgetragen.

eine Einheitslänge von ca. 140 Np errechnete, konnte dieses DNA-Fragment von ca. 175 Np nicht durch Spaltung der DNA zwischen dicht aneinandergereihten Untereinheiten ent-

standen sein. Es ist anzunehmen, daß es dagegen den DNA-Gehalt von Untereinheiten repräsentiert, zwischen denen größere Bereiche histonfreier DNA lagen und die vermutlich durch die zusätzliche Bindung von H1 175 Np vor dem Nukleaseangriff schützen konnten, d. h. ca. 35 Np mehr als durch den Komplex der vier kleinen Histone allein geschützt wurden.

Um die Frage zu beantworten, ob möglicherweise Nicht-histonproteine, die zusätzlich zu den fünf Histonen in Nukleosomen gefunden werden (18), für den DNA-Gehalt der Nukleosomen von 200 Np verantwortlich sind, wurden Kalbsthymuszellkerne in 2 M NaCl oder 2 M NaCl, 5 M Harnstoff dissoziiert und Komplexe im Salzgradienten ohne Harnstoff (4.4.3.) rekonstituiert. Auch diese Komplexe ergaben nach Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease nur diskrete DNA-Fragmente mit einer Einheitslänge von ca. 140 Np. Neben diesem Befund spricht gegen eine in allen Nukleosomen der Zelle ähnliche Strukturfunktion der Nicht-histonproteine ihre große Heterogenität.

Außer der Totalrekonstitution von Komplexen aus isolierten Komponenten wurde die Rekonstitution von Nukleosomen ausgehend von H1-freiem Chromatin versucht. Wenn Kalbsthymuschromatin zunächst 3 Std. bei 0 °C mit 0,63 M NaCl behandelt wurde, um H1 von Chromatin zu dissoziieren, und anschließend - ohne H1 abzutrennen - wieder gegen Puffer dialysiert wurde (Chromatin mit reassoziertem H1), führte die Inkubation mit Mikrokokkus-Nuklease zu DNA-Fragmenten mit einer Längeneinheit von ca. 200 Np. Demnach war das Nukleosomen-Raster im Chromatin mit reassoziertem H1 zum größten Teil erhalten geblieben; der Mikrokokkus-Nuklease-Abbau nach der NaCl-Behandlung hatte jedoch zu einer Verbreiterung der Banden und zu einer Verschiebung zu kleineren Molekulargewichten hin geführt.

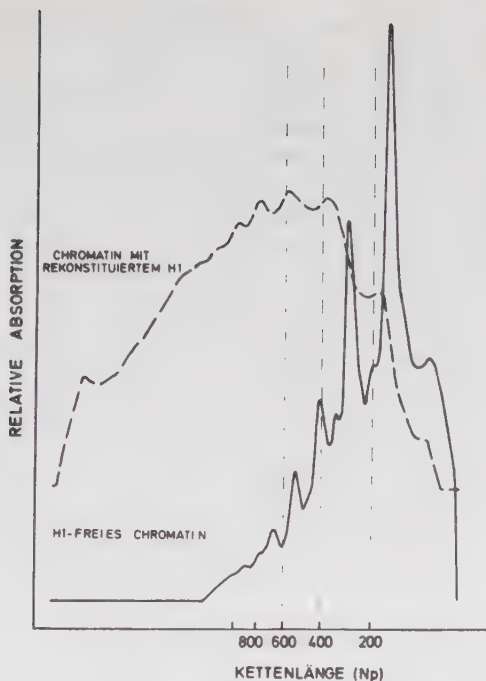


Abb. 25 Chromatin mit rekonstituiertem H1 wird im Vergleich zu H1-freiem Chromatin durch Mikrokokkus-Nuklease deutlich langsamer abgebaut

Chromatin mit rekonstituiertem H1 (1 H1 pro 200 Np DNA) und H1-freies Chromatin wurden unter gleichen Bedingungen je 3 Min., wie in der Legende zu Abb. 21 beschrieben, inkubiert und analysiert. In der Abb. werden die Densitogramme der gelelektrophoretischen Auftrennungen der DNA-Fragmente gezeigt.

Weiterhin wurde H1-freies Chromatin in 0,63 M NaCl mit reinem H1 (1 oder 1,5 Moleküle H1/200 Np DNA) versetzt und rekonstituiert. Das mit H1 rekonstituierte Chromatin zeigte auch nach längerer Inkubation mit Mikrokokkus-Nuklease noch Banden im 200 Np-Raster, die von H1-freiem

Chromatin nur zu sehr kurzen Spaltzeiten erhalten wurden, wenn es unter gleichen Bedingungen abgebaut wurde. Der "Untergrund" an längenheterogenen DNA-Fragmenten war in beiden Fällen etwa gleich groß. In Abb. 25 werden die Densitogramme der Fragmentmuster miteinander verglichen, die nach 3 Min. Abbau von H1-freiem Chromatin bzw. von Chromatin erhalten wurden, das mit H1 rekonstituiert worden war. Während der Abbau des H1-freien Chromatins unter diesen Bedingungen nur noch zu Fragmenten im kleineren Raster führte, ergab mit H1 rekonstituiertes Chromatin Fragmente im 200 Np-Raster. Extensiver Abbau durch Mikrokokkus-Nuklease führte jedoch auch im Chromatin, das mit H1 rekonstituiert worden war, zum Auftreten von Banden im kleineren Raster wie sie im H1-freien Chromatin beobachtet wurden. Mit H1 rekonstituiertes Chromatin wurde demnach durch Mikrokokkus-Nuklease zu den gleichen DNA-Fragmenten wie vor der Rekonstitution abgebaut, jedoch deutlich langsamer. Möglicherweise läßt sich die verzögerte Spaltung des Chromatins mit rekonstituiertem H1 dadurch erklären, daß der Histon-DNA-Komplex nach der Rekonstitution im Unterschied zum löslichen Komplex des Chromatins in Suspension vorlag und deshalb durch Mikrokokkus-Nuklease nur langsam angegriffen werden konnte.

Komplexe, die aus DNA und allen fünf Histonen rekonstituiert worden waren, sowie Chromatin mit reassoziertem H1 und Chromatin mit rekonstituiertem H1 ergaben beim Abbau mit DNAase I die Serie einzelsträngiger DNA-Fragmente wie sie von Kalbsthymuszellkernen erhalten wurden. Proteolyse von H1 oder den anderen vier Histonen während der Rekonstitutionsprozeduren konnte aufgrund von SDS-Gelen als mögliche Ursache für das Ausbleiben der Rekonstitution von Nukleosomen im 200 Np-Raster ausgeschlossen werden (vgl. Abb. 20).

2.2.4. Abbau mit DNAase II

DNAase II unterscheidet sich von den bisher diskutierten Nukleasen dadurch, daß sie zur Entfaltung ihrer Aktivität keine divalenten Kationen benötigt. Divalente Kationen haben aber einen ausgeprägten Einfluß auf die Chromatinstruktur; sie führen bereits in sehr geringen Konzentrationen zur Kondensation des Chromatins. Die Kondensation ist an die Anwesenheit von H1 gebunden und kann auch mit monovalenten Kationen, jedoch erst in sehr viel höheren Konzentrationen, erreicht werden (45). Bisherige Untersuchungen zur Kondensation der DNA wurden vorwiegend mit physikalischen Methoden, wie Ultrazentrifugation und magnetische Kernresonanz vorgenommen. DNAase II bietet dagegen die Möglichkeit, den Einfluß von divalenten Kationen auf die Chromatinstruktur mit einer biochemischen Methode zu untersuchen.

Beim Abbau von Maus- und Rattenleberzellkernen mit DNAase II hat sich eine weitere charakteristische Besonderheit der Nuklease gezeigt: Während Mikrokokus-Nuklease präferentiell im internukleosomen DNA-Bereich spaltet und dadurch DNA-Fragmente erzeugt, die sich jeweils um ca. 200 Np unterscheiden, ist für DNAase II neben der internukleosomen Spaltstelle eine zweite intranukleosomale Stelle etwa gleich gut zugänglich, so daß doppelsträngige DNA-Fragmente entstehen, die sich jeweils um 100 Np unterscheiden (66, 67). Weiterhin wurde gezeigt, daß die Zugänglichkeit der intranukleosomen Spaltstelle für DNAase II in Chromatin, das durch mehrfaches Waschen der Mäuseleberkerne mit 20 mM EDTA präpariert wurde, an die Anwesenheit von CaCl_2 (1 mM) oder NaCl (150 mM) gebunden ist (66).

In Übereinstimmung damit führte der Abbau von Kaltsthyms-

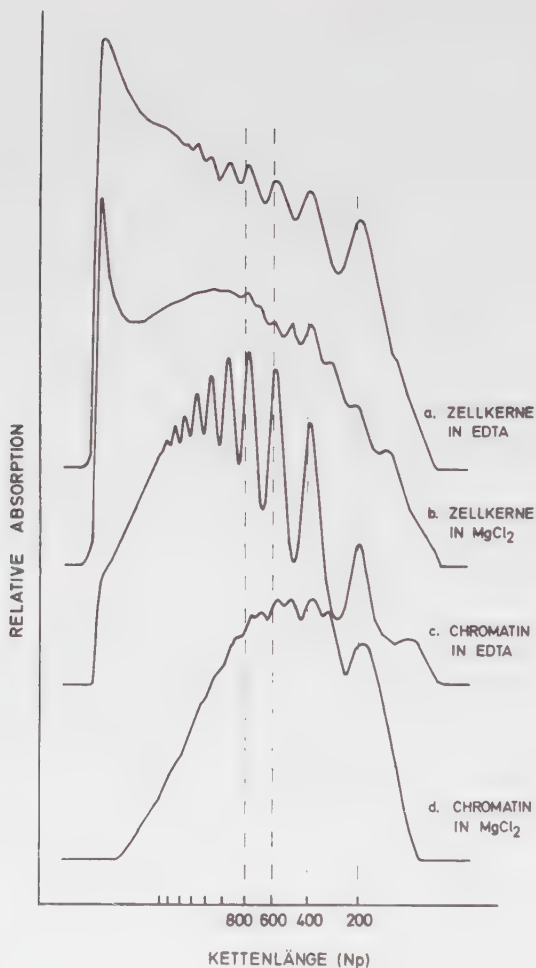


Abb. 26 In Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen werden Kalbsthymuszellkerne und Chromatin durch DNAase II zu einem anderen DNA-Fragmentmuster abgebaut als in Gegenwart von EDTA Kalbsthymuszellkerne (je 0,5 mg DNA), die, wie unter 4.3.1. beschrieben, präpariert wurden, wurden a, dreimal gewaschen und resuspendiert in je 500 μ l 10 mM Tris-

HCl, pH 7, 0,7 mM EDTA, 1 mM PMSF und bei 37 °C mit 50 U/ml DNAase II 30 Min. inkubiert. b, Kalbsthymuszellkerne wurden zweimal gewaschen und resuspendiert in je 500 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 7, 0,3 mM MgCl₂, 1 mM PMSF und bei 37 °C mit 20 U/ml DNAase II 2 Std. inkubiert. Nach 4.3.2. präpariertes Kalbsthymuschromatin in 10 mM Tris-Kakodylat, pH 7, 0,7 mM EDTA, 1 mM PMSF wurde in einer Konzentration von 0,7 A₂₆₀-Einheiten/ml c, 15 Min. bei 37 °C vorinkubiert und mit 20 U/ml DNAase II 5 Min. abgebaut. d, Kalbsthymuschromatin wurde nach Zusatz von 1 mM MgCl₂ 15 Min. bei 37 °C vorinkubiert und mit 20 U/ml DNAase II 60 Min. abgebaut. Je 0,1 - 0,15 A₂₆₀-Einheiten DNA wurden in einem 2 %igen Agarose-Plattengel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Anfärbung mit Äthidiumbromid wurde das Gel fotografiert und das Negativ densitometriert.

chromatin mit DNAase II in 0,7 mM EDTA lediglich zu Banden im 200 Np-Raster, wie sie entsprechend in 0,4 mM CaCl₂ beim Abbau der gleichen Probe mit Mikrokokkus-Nuklease erhalten wurden (Abb. 26 c, vgl. Abb. 22 a). In Tab. 3 sind die Kettenlängen der jeweiligen Fragmente angegeben; die Einheitslänge betrug 193 ± 7 Np in guter Übereinstimmung mit der Einheitslänge der Fragmente, die durch Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease entstanden (vgl. Tab. 2). Beide Nukleasen spalten unter diesen Bedingungen präferentiell im internukleosomalen Bereich (22, 66). Die Inkubation mit DNAase II führte jedoch zusätzlich zur Spaltung im intranukleosomalen Bereich und damit zu dem erwähnten charakteristischen Muster von Fragmenten mit einer nur halb so großen Einheitslänge, wenn zum Chromatin vor der Inkubation MgCl₂ ad 1 mM gegeben wurde, so daß die Konzentration an freiem MgCl₂ nach Kompensation des EDTA 0,3 mM betrug (Abb. 26 d): Zusätzlich zu den Banden, die durch Abbau in EDTA erhalten wurden, waren über einem relativ hohem "Untergrund" längenheterogener DNA-Fragmente "Zwischenbanden" zu erkennen. Aus den Kettenlängendifferenzen der DNA-Fragmente errechnete sich eine Einheitslänge von 93 ± 11 Np (Tab. 3). Kalbsthymuschromatin wurde ebenfalls in diesem Raster gespalten,

Bande ^a	Kalbsthymus-					
	Kerne ^b		Chromatin ^c		H1-freies Chromatin ^d	
	0,7 mM EDTA	0,3 mM MgCl ₂	0,7 mM EDTA	0,3 mM MgCl ₂	0,7 mM EDTA	0,3 mM MgCl ₂
1	190	130	205	193	185	190
2	385	220	380	322	330	320
3	590	320	580	385	450	450
4	780	380	770	472	560	560
5	960	485	960	570	710	695
6	1180	580	1175	690	880	860
7	1380	700	1340	760		
8	1570	790	1560			
9	1750		1750			

Länge der Einheit^e

195±5	94±7	193±7	93±11	139±11	133±9
-------	------	-------	-------	--------	-------

Tab. 3 Größen der DNA-Fragmente nach Abbau mit DNAase II (Nukleotidpaare)^a

a Siehe Anmerkung a in Tab. 2

b, c, d Kettenlängen der DNA-Fragmente in den Abb. 26 und 27

e Siehe Anmerkung f in Tab. 2

wenn statt MgCl₂ NaCl (100 mM) zugegeben wurde.

Auch beim Abbau von Kalbsthymuszellkernen mit DNAase II wurde gefunden, daß die Zugänglichkeit der intranukleosomalen Spaltstelle von den Ionenbedingungen abhängig ist (Abb. 26 a und b). In 0,7 mM EDTA konnte die Nuklease nur alle 195 ± 5 Np spalten, während in 0,3 mM MgCl₂

alle 94 ± 7 Np gespalten wurde (Tab. 3). Zusatz von CaCl_2 ad 0,3 mM hatte den gleichen Effekt wie Zusatz von MgCl_2 . Das Waschen der Kerne mit 0,7 mM EDTA führte zur Lyse, während die Kernstruktur in 0,3 mM MgCl_2 erhalten blieb.

Zusätzlich zu diesen Doppelstrangbrüchen führt die Inkubation mit DNAase II wie mit DNAase I zu Einzelstrangbrüchen (66). In Übereinstimmung damit ergab die elektrophoretische Analyse der einzelsträngigen DNA-Fragmente einer extensiven Verdauung von Kalbsthymuszellkernen mit DNAase II unter denaturierenden Bedingungen ein Muster von DNA-Fragmenten wie es durch Abbau mit DNAase I erhalten wurde.

Auch H1 -freies Chromatin wurde in 0,7 mM EDTA durch DNAase II ähnlich wie durch Mikrokokkus-Nuklease (in Gegenwart von CaCl_2) abgebaut. Zunächst führte die Inkubation mit DNAase II zu DNA-Fragmenten mit einer Einheitslänge von ca. 200 Np, weiterer Abbau ergab DNA-Fragmente, deren Längen Vielfache der kleineren Einheitslänge von ca. 140 Np waren (Abb. 27 und Tab. 3). Während jedoch in Zellkernen und Chromatin in einem Überschuß divalenter (oder monovalenter) Kationen neben der internukleosomalen eine zweite, intranukleosomale Spaltstelle für DNAase II zugänglich wurde, wurde H1 -freies Chromatin durch DNAase II in An- oder Abwesenheit divalenter Kationen gleich abgebaut. Abb. 27 zeigt, daß die Inkubation von H1 -freiem Chromatin mit DNAase II in 0,3 mM MgCl_2 nicht zum Auftreten von "Zwischenbanden" führte, sondern ein DNA-Fragmentmuster ergab, das dem in 0,7 mM EDTA erhaltenen entsprach.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich (obwohl nicht bewiesen), daß divalente oder monovalente Kationen über das Histon H1 die Zugänglichkeit der intranukleosomalen Spaltstelle für DNAase II beeinflussen.

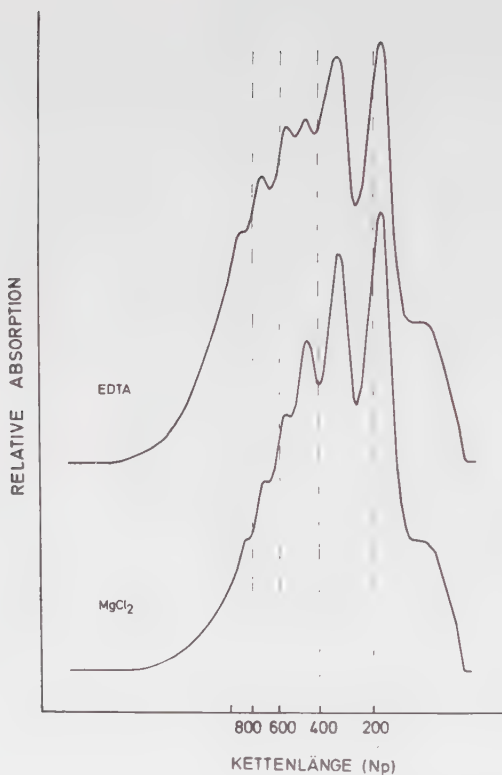


Abb. 27 H1-freies Chromatin wird durch DNAase II in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen ähnlich wie in Gegenwart von EDTA abgebaut

Nach 4.3.3. präpariertes H1-freies Chromatin wurde, wie in der Legende zu Abb. 26 beschrieben, mit 20 U/ml DNAase II 30 Min. (0,7 mM EDTA) bzw. 60 Min. (0,3 mM $MgCl_2$) inkubiert und die DNA in einem 2 %igen Agarose-Plattengel analysiert.

3. DISKUSSION

3.1. Rekonstitution von Nukleosomenkernen

Wie in der Arbeit gezeigt wird, entstehen beim Abbau von Kalbsthymuszellkernen mit Mikrokokkus-Nuklease DNA-Fragmente, deren Größen ganzzahlige Vielfache einer Einheit von 195 ± 4 Np sind. Die Länge der Einheit in Kalbsthymuszellkernen stimmt gut überein mit der Einheitslänge von 198 ± 6 Np, die in Ref. 62 für Rattenleberzellkerne bestimmt wurde. Von anderen Autoren (19) wurde für Kalbsthymus ein Wert von 110 - 175 Np angegeben. Der Unterschied erklärt sich durch falsche Kettenlängen, der dort (Ref. 19) zur Eichung verwendeten PM2-Hae III-Fragmente (16).

Aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen anderer Autoren (22) ist es bekannt, daß die Einheitslänge der DNA-Fragmente, die nach Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease auftreten, dem DNA-Gehalt eines Nukleosoms entspricht. Das bedeutet, daß in Rattenleber- und Kalbsthymuszellkernen ein DNA-Segment von gleicher Länge pro Nukleosom gebunden ist. Neuere Untersuchungen (68 - 70) haben aber gezeigt, daß der DNA-Gehalt der Nukleosomen in verschiedenen Eukaryonten sehr unterschiedlich sein kann und von 154 Np in *Aspergillus* (69) bis zu 241 Np in Seeigelspermien (70) variieren kann. Man konnte jedoch zeigen, daß verschiedenen Nukleosomen ein gemeinsamer Kern zugrunde liegt mit gleichem DNA- und Histongehalt (16, 68 - 75). Diese sogenannten Nukleosomenkerne haben eine Sedimentationskonstante von 11,2 S (64, 73) und bestehen aus ca. 140 Np DNA und einem Histonkomplex, der - wie gegenwärtig angenommen wird - je zwei Moleküle H2A, H2B, H3 und H4 (aber kein H1) enthält. Es wird diskutiert (Ref. 16), daß die DNA-Menge, die zusätzlich zu den 140 Np im Nukleosomen-

kern pro Nukleosom gebunden wird, durch Unterschiede im Histon H¹ bestimmt wird.

In dieser Arbeit wurden Komplexe aus den vier Kalbsthymushistonen H2A, H2B, H3 und H4 mit homologer und heterologer DNA rekonstituiert und anschließend mit Mikrokokkus-Nuklease abgebaut. Dabei trat eine Serie von DNA-Fragmenten auf, deren Größen Vielfache einer Einheitslänge von 137 ± 7 Np waren. Die Tatsache, daß alle vier erwähnten Histone hierfür essentiell waren, daß die Kettenlängen der DNA-Fragmente eine arithmetische Reihe bildeten und daß die Größe der Einheitslänge mit der von Nukleosomenkernen übereinstimmte, machen es sehr wahrscheinlich, daß die Rekonstitution zu dicht aneinandergereihten Nukleosomenkernen geführt hat. Auch die partikulären Strukturen der rekonstituierten Komplexe, die im Elektronenmikroskop beobachtet wurden, stimmen mit dieser Annahme überein. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sich die rekonstituierten Untereinheiten als diskrete Komplexe in Lösung isolieren ließen, die aufgrund ihrer Sedimentationskonstanten (11,6 S), ihrer Histonzusammensetzung (H2A, H2B, H3 und H4) und aufgrund der Länge der DNA (140 - 145 Np) den aus Chromatin isolierten Nukleosomenkernen (vgl. Ref. 16, 68 - 75) entsprechen.

Ebenfalls im Einklang mit der Annahme, daß die Rekonstitution unter diesen Bedingungen zu Nukleosomenkernen führt, ist die Serie einzelsträngiger DNA-Fragmente, die nach Inkubation der rekonstituierten Komplexe sowie der isolierten Untereinheit mit DNAase I entstand. Diese Serie von Fragmenten wurde von anderen Autoren (73, 75) auch beim Abbau von Nukleosomenkernen gefunden, die aus Chromatin isoliert wurden. Schließlich führte der extensive Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease zu einem charakteristischen Muster subnukleosomaler Fragmente mit Größen zwischen 70 und 140 Np, die auch beim Abbau von Kalbs-

thymuszellkernen gefunden wurden. Diese Ergebnisse sprechen insbesondere dafür, daß die Rekonstitution im wesentlichen zu einer Anordnung der DNA in den Untereinheiten geführt hat, die der in-vivo-Struktur sehr ähnlich ist.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde auch von anderen Autoren gezeigt, daß Komplexe, die aus einem Gemisch der vier Histone und DNA rekonstituiert worden waren, sehr ähnliche DNAase I-Fragmentmuster und subnukleosomale DNA-Fragmente nach extensivem Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease ergaben wie sie von Chromatin erhalten wurden (57, 58). Es gelang ihnen jedoch nicht, durch partiellen Abbau ihrer Komplexe mit Mikrokokkus-Nuklease diskrete DNA-Fragmente zu erhalten, deren Kettenlängen Vielfache der pro Untereinheit gebundenen DNA-Menge darstellten (57).

Zur Rekonstitution von Nukleosomenkernen waren die vier Histone H2A, H2B, H3 und H4 nötig. Mit einzelnen Histonen oder mit den Histonkomplexen (H2A, H2B) oder (H3, H4) allein ließen sich keine Histon-DNA-Komplexe rekonstituieren, die beim Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease zu diskreten DNA-Fragmenten mit einer Längeneinheit von 140 Np führten. In Übereinstimmung damit wurde aufgrund von Röntgenbeugungsstudien (6) und elektronenmikroskopischen Untersuchungen (15) rekonstituierter Komplexe auch von anderen Autoren gefolgert, daß alle vier kleinen Histone zum Aufbau der Chromatinuntereinheit benötigt werden. Darüberhinaus wird aufgrund biochemischer Untersuchungen rekonstituierter Komplexe diskutiert (57, 58), daß die Anordnung der DNA in den Untereinheiten im wesentlichen durch die beiden Histone H3 und H4 bestimmt wird. Die Autoren konnten zeigen, daß sich aus DNA und den argininreichen Histonen allein (aber nicht den lysinreichen Histonen allein) ein Komplex rekonstituieren läßt, der

beim Abbau mit DNAase I und bei extensivem Abbau mit Mikrokokus-Nuklease teilweise zu ähnlichen DNA-Fragmenten führt wie sie beim Abbau von Chromatin auftreten.

3.2. Präferentielle Bindung von Histonen an bestimmte DNA-Sequenzen

In dieser Arbeit wurde die Frage einer präferentiellen Bindung von Histonen an bestimmte DNA-Sequenzen durch die Spaltung von Histon-DNA-Komplexen mit Restriktionsnukleasen untersucht. Diese Methode war zum Zeitpunkt der Durchführung der hier beschriebenen Experimente von anderer Seite noch nicht angewandt worden. Mit anderen Untersuchungsmethoden dagegen hatte eine Reihe von Autoren präferentielle Bindung von Histonen oder histon-ähnlichen Polypeptiden an bestimmte DNA-Sequenzen gefunden (31 - 33, 76). In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, daß einzelne Histone und - unter bestimmten Bedingungen - auch der $(H3)_2(H4)_2$ -Tetramerkomplex präferentiell zwei von fünf Spaltstellen für die Restriktionsnuklease Hind II auf λ dv 21-DNA schützen können. Wenn dagegen Komplexe aus λ dv 21-DNA und einem Gemisch der vier Histone, die für die Bildung von Nukleosomenkernen benötigt werden, mit Hind II gespalten wurden, wurde gleichmäßiger Schutz aller fünf Hind II-Spaltstellen auf der λ dv 21-DNA gefunden.

Hieraus läßt sich der Schluß ziehen, daß Histone ihre Fähigkeit, bestimmte DNA-Sequenzen präferentiell zu binden, im Nukleosomenkern verlieren und daß die Nukleosomenkerne - bezogen auf die fünf Spaltstellen - zufällig auf dem DNA-Molekül verteilt sind. Damit stimmt eine ähnliche Beobachtung anderer Autoren überein (77): Von

ihnen wurde die Lokalisierung der Histone im Histon-SV-40-DNA-Komplex, der aus gereinigten Viren isoliert wurde, mit Hilfe von Restriktionsnukleasen untersucht. Der Komplex enthielt die vier kleinen Histone der Wirtszelle, aber kein H1. Aus dem Muster der DNA-Fragmente, das nach der Spaltung des Komplexes mit der Restriktionsnuklease Hind III auftrat, wurde geschlossen, daß die Histone bezogen auf die Hind III-Spaltstellen wahllos über die SV 40-DNA verteilt vorliegen. Zu dem gleichen Schluß kamen Autoren (78), die mit Hilfe der Restriktionsnuklease EcoRI die Verteilung der Histone auf SV 40-DNA in Komplexen untersuchten, die aus den Zellkernen permissiver Zellen isoliert wurden.

Ein zusätzliches Argument dafür, daß Nukleosomenkerne keine spezifischen DNA-Sequenzen enthalten, liefert der Befund (18), daß mehr als 85 % der DNA im Chromatin in Nukleosomen gebunden vorliegen. In dieser Dissertation wurde außerdem gezeigt, daß sich Nukleosomenkerne auch mit Phagen-DNAs bilden, die "in vivo" nicht mit Histonen assoziiert sind. Das bedeutet - in Übereinstimmung mit dem gleichen Befund anderer Autoren (15, 79) -, daß zur Bildung von Nukleosomenkernen keine "typisch eukaryontischen" DNA-Sequenzen nötig sind.

Es wird angenommen (7, 65), daß die vier kleinen Histone aufgrund spezifischer Histon-Histon-Wechselwirkungen im Nukleosomenkern einen definierten Oktamerkomplex bilden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß erst die Konformationsänderungen, die die vier einzelnen Histone im Nukleosomenkern erfahren, zur unspezifischen Wechselwirkung mit der DNA-Doppelhelix führen. Das bedeutet, daß bei der Interpretation aller Versuche, in denen Komplexe aus DNA und einzelnen Histonen untersucht werden, zu beachten ist, daß die gewonnenen Ergebnisse möglicherweise nicht das Verhalten der Histone im Chromatin widerspiegeln.

3.3. Überführung von Nukleosomen in Nukleosomenkerne

Wenn aus Kalbsthymuskernen nach einer schonenden Methode Chromatin präpariert wurde, blieben der DNA-Gehalt pro Nukleosom von ca. 200 Np und die Anordnung der DNA innerhalb der Nukleosomen erhalten. Es war jedoch möglich, im Chromatin den DNA-Gehalt pro Untereinheit zu verändern, und zwar durch Extraktion von H1 mit 0,63 M NaCl. In diesem Fall führte der Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease zunächst zu einem Fragmentmuster, dem eine Einheitslänge von 192 ± 12 Np zugrunde lag und das dem des unbehandelten Chromatins entsprach. Relativ rasch ging es jedoch in ein Fragmentmuster mit einer Einheit von 136 ± 8 Np über.

Wie läßt sich das Auftreten von Untereinheiten im Raster von ca. 140 Np DNA erklären? Aufgrund der Befunde anderer Autoren (73 - 75) ist anzunehmen, daß durch Verlust von H1 (und Nichthistonproteinen) aus Kalbsthymusnukleosomen mit einem DNA-Gehalt von ca. 200 Np Nukleosomenkerne mit einem DNA-Gehalt von ca. 140 Np entstehen; die 60 Np, die dadurch für Nukleasen zugänglich werden, liegen entweder als histonfreie DNA zwischen den Kern-Partikeln vor, wie in Abb. 28 angenommen, oder sind möglicherweise lose auf der Oberfläche der Nukleosomenkerne gebunden. Das Auftreten von diskreten DNA-Fragmenten, deren Kettenlängen Vielfache von 140 Np sind, zeigt jedoch, daß sich im H1-freien Chromatin nicht nur die Größe der pro Untereinheit vor Nukleaseangriff geschützten DNA, sondern auch der Abstand der Untereinheiten voneinander geändert haben muß. Es ist anzunehmen, daß die Veränderung des Rasters durch eine Verschiebung der Nukleosomenkerne entlang der DNA zustande gekommen ist (Abb. 28), da - wie in Ref. 80 gezeigt wird - in 0,63 M NaCl die Histon-DNA-Wechselwirkungen teilweise gelockert sind. Möglicherweise

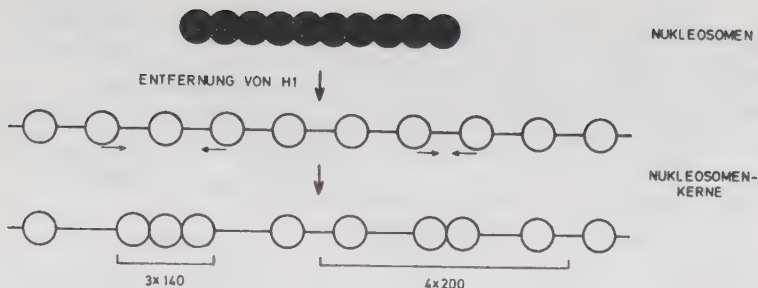


Abb. 28 Verschiebung von Nukleosomenkernen in H1-freiem Chromatin

Entfernung von H1 überführt Nukleosomen in Nukleosomenkerne mit einem DNA-Gehalt von ca. 140 Np, die in der zur Extraktion verwendeten Salzlösung von 0,63 M NaCl "zusammenrutschen" können.

führt erst der hohe hydrostatische Druck während der Ultrazentrifugation des H1-freien Chromatins in 0,63 M NaCl nach Dissoziation des H1-Histons zu der in Abb. 28 schematisch dargestellten Auffaltung der Untereinheiten (vgl. 75) und zur Verschiebung der Nukleosomenkerne.

Mit dieser Vorstellung sind die experimentellen Befunde der Spaltung des H1-freien Chromatins mit Mikrokokkus-Nuklease gut zu erklären: Die primär gebildeten DNA-Fragmente, denen eine Einheitslänge von ca. 200 Np zugrunde liegt, entstehen durch Spaltung in der am leichtesten zugänglichen DNA zwischen weiter entfernten Nukleosomenkernen. Der erhöhte Anteil an längenheterogenen Fragmenten ist dabei bedingt durch die Zunahme der Länge histonfreier DNA infolge der Ablösung von H1 und durch die Verschiebung der Untereinheiten. Längere Inkubation führt dann zum weitergehenden Abbau der zugänglichen DNA und

schließlich auch zur Spaltung der DNA zwischen dicht aneinandergereihten Nukleosomenkernen und damit zur DNA-Fragmenten, deren Größen Vielfache der kleineren Einheitslänge von 140 Np sind. Eine Bestätigung für diese Vorstellungen liegt in dem Befund, daß der Abbau des H¹-freien Chromatins mit einer anderen Nuklease, DNAase II, einen sehr ähnlichen Verlauf nimmt.

Die DNAase I-Muster zeigen, daß die Anordnung der DNA auf der Oberfläche der Nukleosomenkerne durch die Extraktion mit NaCl nicht verändert wurde. Das Auftreten von einzelsträngigen DNA-Fragmenten bis zu einer Länge von 250 N (Abb. 23) spricht außerdem dafür, daß ein Teil der Nukleosomenkerne sehr genau im Raster angeordnet war.

Ob zusätzlich zur Verschiebung entlang der DNA Neuverteilungen der Nukleosomenkerne zwischen verschiedenen DNA-Doppelsträngen aufgetreten sind, ist fraglich. Nach Ref. 80 sind Histonneuverteilungen in 0,63 M NaCl möglich, jedoch wurde von anderen Autoren (81) ein Austausch von Chromatinuntereinheiten erst oberhalb 0,8 M NaCl beobachtet. Nukleosomenkerne selbst sind kein Produkt von Histonneuverteilungen, da sie von anderen Autoren (75) auch dann gefunden werden, wenn H¹ aus Rattenleberchromatin mit tRNA statt mit NaCl unter Bedingungen extrahiert wird, unter denen keine Neuverteilungen auftreten. Unter diesen Bedingungen führt der anschließende Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease jedoch nicht zu DNA-Fragmenten, deren Kettenlängen Vielfache einer Einheit von 140 Np sind (Ref. 75). Zur Verschiebung der Nukleosomenkerne ist daher offensichtlich eine weitergehende Lockerung der Histon-DNA-Wechselwirkungen durch höhere Ionenstärken nötig.

Von anderen Autoren (15) wurden in elektronenmikrosko-

pischen Untersuchungen von NaCl-behandeltem H1-freien Chromatin lange Bereiche histonfreier DNA gefunden, die nicht in Untereinheiten eingepackt waren. Aufgrund der hier diskutierten Ergebnisse ist es möglich anzunehmen, daß diese histonfreie DNA durch Verschiebung von Nukleosomenkernen entstanden ist.

In Übereinstimmung mit den Rekonstitutionsversuchen und den Befunden anderer Autoren (73 - 75) zeigen die Ergebnisse dieser Dissertation, daß H1 im Chromatin nicht an der Struktur der Nukleosomenkerne beteiligt ist. Weiterhin sprechen sie dafür, daß H1 mit der DNA im Bereich zwischen den Nukleosomenkernen assoziiert ist wie auch in Ref. 72 - 75 angenommen wird.

3.4. Bindet H1 an Nukleosomenkerne?

Da die Rekonstitution von DNA mit den vier kleinen Histonen zu Nukleosomenkernen führt, in Nukleosomen dagegen zusätzlich H1 (und Nichthistonproteine) gebunden sind, lag es nahe zu versuchen, aus DNA und einem Gemisch aller fünf Kalbsthymushistone Nukleosomen mit einem DNA-Gehalt von ca. 200 Np zu rekonstituieren.

Die Tatsache, daß dies unter einer Vielzahl verschiedener Bedingungen nicht möglich war und daß auch Chromatin nach Dissoziation und Reassoziaton der Komponenten in einem Salz-Gradienten lediglich Untereinheiten im Raster von ca. 140 Np ergab (Ref. 61 und diese Arbeit), bedeutet wahrscheinlich, daß unter den Rekonstitutionsbedingungen keine Wechselwirkungen zwischen dem Histonkomplex im Nukleosomenkern und H1 auftreten. Infolgedessen bindet H1 bei Erniedrigung der Ionenstärke unabhängig von den anderen Histonen an DNA. Nukleosomenkerne, die im

Raster von 140 Np aneinandergereiht sind, werden durch H1 nicht getrennt. Daneben führt jedoch die Rekonstitution von DNA mit den vier kleinen Histonen und H1 offensichtlich zu Untereinheiten, die durch längere Bereiche histonfreier DNA getrennt sind, und in denen ca. 175 Np DNA relativ gut vor Nukleaseangriff geschützt werden. Es ist möglich, daß diese Untereinheiten eine Struktur besitzen, die auch in Nukleosomen vorhanden ist, da Fragmente ähnlicher Größe ebenfalls beim Abbau von Kalbsthymuszellkernen auftreten. Der Befund, daß H1 in Histon-DNA-Komplexen zum Schutz eines zusätzlichen subnukleosomalen Fragments führt, wurde auch von anderen Autoren beschrieben (57, 72, 79).

Mit der Annahme, daß H1 unabhängig von den vier kleinen Histonen an die DNA bindet, stimmt die Beobachtung überein, daß zwar die Spezifität der Bindung der vier kleinen Histone an λ iv 21-DNA durch Wechselwirkungen untereinander aufgehoben wurde, H1 aber unabhängig von den anderen vier Histonen seine spezifische Bindung beibehält. Aufgrund von Neutronenbeugungsstudien an Chromatin wurde auch von anderen Autoren (82) eine direkte, von anderen Histonen unabhängige Wechselwirkung des Histons H1 mit der DNA vorgeschlagen.

Wenn H1 mit 0,65 M NaCl von Chromatin dissoziiert und anschließend durch Erniedrigung der Ionenstärke reassoziert wird, bindet es möglicherweise wieder an die Stellen, an die es ursprünglich gebunden war, so daß nach Abbau mit Nuklease-DNA-Fragmente im Raster von ca. 140 Np entstehen (Chromatin mit reassoziertem H1). Soziale Verschiebung der Nukleosomenkerne im H1-freien Chromatin stattgefunden hatte, ließ sich das 200 Np-DNA-Raster mit reassoziertem H1 vollständig rekonstituieren (Chromatin mit reassoziertem H1). Auch in diesem Fall werden

aneinandergereihte Nukleosomenkerne nicht durch H1 in das Nukleosomenraster "zurückgeschoben".

Wie entstehen "in vivo" Kalbsthymusnukleosomen mit einem DNA-Gehalt von ca. 200 Np ? Es ist bekannt, daß neusynthetisierte Histone, bevor sie an DNA binden, modifiziert werden (30). Auch die Histone, die bereits mit der DNA assoziiert sind, werden während der Neusynthese des Chromatins modifiziert (30). Es ist gut möglich, daß die Modifikationen der Histone dazu beitragen, die Assoziation von Nukleosomen zu ermöglichen.

3.5. Einfluß von H1 auf die Zugänglichkeit von internukleosomalen Spaltstellen

Es wird allgemein angenommen (Ref. 28), daß H1 im Chromatin für die Ausbildung einer Überstruktur der Nukleosomenkette verantwortlich ist. Für diese Annahme spricht der seit längerer Zeit bekannte Befund (45), daß die Anwesenheit von H1 zu einer starken Kondensation des Chromatins in physiologischer Kochsalzlösung bzw. in Gegenwart divalenter Kationen führt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluß von H1 und von divalenten Kationen auf den Abbau des Chromatins durch DNAase II untersucht. Wie in unserem Labor gefunden wurde, spaltet DNAase II die DNA in Maus- und Rattenleberzellkernen nicht nur im internukleosomalen Bereich wie Mikrokokkus-Nuklease, sondern auch mit etwa gleicher Wahrscheinlichkeit an einer intranukleosomalen Stelle (66, 67). Aus den in dieser Dissertation beschriebenen Versuchen ist zu folgern, daß auch in Kalbsthymuszellkernen und Chromatin in Gegenwart von 0,3 mM $MgCl_2$ inter- und intranukleosomale Spaltstellen für DNAase II etwa gleich gut zugänglich sind. In Abwesenheit divalenter Kationen da-

gegen, d.h. in 0,7 mM EDTA, spaltete DNAase II mit deutlicher Präferenz im internukleosomalen Bereich. Präferentielle Spaltung im internukleosomalen Bereich wurde ebenfalls beobachtet, wenn H1-freies Chromatin abgebaut wurde, und zwar sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit divalenter Kationen.

Von anderen Autoren (Ref. 83) wurde in jüngster Zeit eine Überstruktur im Chromatin in Form einer helikalen Anordnung dicht aneinandergereihter Nukleosomen (Solenoid) gefunden, deren Auftreten ebenfalls an die gleichzeitige Anwesenheit von H1 und Mg^{2+} -Ionen gebunden ist. In Übereinstimmung damit wurde auch in Ref. 84 eine granuläre Überstruktur des Chromatins beschrieben, die nur in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen, dagegen nicht in Gegenwart von EDTA beobachtet werden konnte.

Warum kann DNAase II unter Bedingungen, unter denen Überstrukturen im Chromatin auftreten, mit gleicher Präferenz im internukleosomalen Bereich und an einer intranukleosomalen Stelle spalten, unter anderen Bedingungen, unter denen keine Überstrukturen gefunden wurden, dagegen nicht? Es ist sehr unwahrscheinlich, daß hierfür zwei unterschiedliche Enzymaktivitäten in der DNAase II-Präparation verantwortlich sind, da H1-freies Chromatin unter beiden Bedingungen gleich gespalten wird. Dagegen ist anzunehmen, daß die unterschiedlichen Spaltungen auf Strukturveränderungen im Chromatin beruhen. Es ist möglich, daß durch Konformationsänderungen in den Nukleosomen bei Ausbildung der Überstruktur die intranukleosomale Stelle exponiert und damit zusätzlich zum internukleosomalen Bereich für DNAase II zugänglich wird. Andererseits könnte jedoch auch ein verstärkter Schutz der DNA im internukleosomalen Bereich durch die Ausbildung der Überstruktur dazu führen, daß beide Stellen für die Nuklease gleich gut zugänglich werden, während in Abwesenheit divalenter Kationen prä-

ferentiell in den internukleosomalen Bereichen der Nukleosomenkette gespalten wird. Für die zweite Annahme spricht, daß der Abbau von Chromatin mit DNAase II in Anwesenheit von $MgCl_2$ etwa um den Faktor zehn langsamer als in 0,7 mM EDTA abläuft, obwohl - wie andere Autoren gezeigt haben (85) - die Aktivität der Nuklease unter diesen Bedingungen durch $MgCl_2$ etwa um den Faktor zwei erhöht ist. H1-freies Chromatin dagegen, das, wie in Ref. 83 gefunden wurde, keine entsprechenden Überstrukturen mehr ausbildet, wird in Anwesenheit von $MgCl_2$ etwa gleich schnell abgebaut wie in Abwesenheit divalenter Ionen. Es ist möglich, daß die Wechselwirkungen von H1 mit der DNA im internukleosomalen Bereich unter dem Einfluß von Kationen für diesen verstärkten Schutz verantwortlich sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß der Abbau von Chromatin mit Nukleasen eine wertvolle Untersuchungsmethode darstellt, die es ermöglicht, Fragen zur Chromatinstuktur, zur Rekonstitution von Nukleosomen und zur Basenspezifität der Histon-DNA-Wechselwirkung zu beantworten. Eine genaue Kenntnis der Chromatinstuktur ist jedoch die Voraussetzung dafür, die äußerst interessante Frage nach dem Zusammenhang zwischen der Struktur des Chromatins und seiner biologischen Aktivität zu untersuchen.

4. MATERIALIEN UND METHODEN

4.1. Desoxyribonukleinsäuren

4.1.1. Präparation linearer PM2-DNA

PM2-DNA wurde in Anlehnung an Ref. 38 und 86 als Gemisch von Form I, II und III isoliert. Form I-DNA wurde von Form II- und Form III-DNA im CsCl-Propidiumdijodid-Gradienten getrennt, ähnlich wie in Ref. 86 für das E. coli 15-Plasmid beschrieben: Pro A260-Einheit in 0,8 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM EDTA wurden 0,4 mg Propidiumdijodid (Calbiochem) und 0,686 g CsCl gelöst ($n = 1,3895$). Die Gleichgewichtszentrifugation wurde im Beckman Ti 60-Rotor bei 33.000 Upm und 15 °C in 90 Std. vorgenommen. Die Gradienten wurden ausgetropft, und die Fluoreszenzintensität des Propidiumdijodids wurde gemessen (Anregung bei 340 nm, Emission bei 590 nm), um die DNA im Gradienten zu lokalisieren. Fraktionen, die Form I der DNA enthielten, wurden mit H₂O auf 1 M CsCl verdünnt, Propidiumdijodid wurde über eine kleine Dowex AG 50 W x 8-Säule (0,8 x 4,5 cm) nach Ref. 87 abgetrennt und die DNA gegen 15 mM NaCl, 1,5 mM Natriumcitrat dialysiert.

Form I-DNA wurde mit einem Gemisch der Restriktionsnukleasen Hind II und Hind III, wie unter 2.1.1.1. beschrieben, zur linearen Form III gespalten. Die Bedingungen waren: DNA-Konzentration 0,1 mg/ml, Enzymkonzentration 8 mU/ml, Inkubationszeit 135 Min., 30 °C.

Nach der Spaltung wurde noch intakte Form I-DNA im CsCl-Propidiumdijodid-Gradienten abgetrennt und das Gemisch von linearer und offen-zirkularer DNA nach Ref. 42 über Agarose-Gelelektrophorese getrennt. Dazu wurde die Agarose bei 45 °C mit der DNA gemischt und dann in die Gelröhrchen gegossen. Anschließend konnte die lineare DNA von der offen-zirkularen Form der DNA, die in der Agarosematrix eingeschlossen blieb, elektrophoretisch getrennt werden, indem man die lineare DNA aus dem Gel herauswandern ließ. Die lineare DNA wurde anschließend gegen 3 M KCl, 10 mM Kaliumphosphat, pH 6,8, dialysiert und auf eine Hydroxylapatitsäule gegeben (1 x 3 cm), um Agaroseverunreinigungen abzutrennen. Nach Waschen der Säule mit 3 M KCl, 10 mM Kaliumphosphat, pH 6,8, wurde die DNA mit einem linearen Gradienten aus 100 ml 10 mM und 100 ml 500 mM Kaliumphosphat, pH 6,8, eluiert. Zum Schluß wurde die DNA gegen 15 mM NaCl, 1,5 mM Natriumcitrat dialysiert.

4.1.2. Präparation von λ dv-DNA

E. coli 866 (λ dv 21) und E. coli m53 (λ dv 1), die die Plasmide λ dv 21 als Dimer bzw. λ dv 1 als Monomer enthalten, waren ein Geschenk von G. Hobom. Die Anzucht der Bakterien und die Isolierung der DNAs erfolgten ähnlich wie in Ref. 50 für 1 l-Kulturen beschrieben. Für eine 10 l-Kultur wurden 8 l Medium (22,5 g Hefeextrakt, 10 g Bactotrypton, 5 g NaCl pro Liter) mit vier 500 ml-Übernachtskulturen angeimpft. Gleichzeitig wurden 150 ml 1 M Kalium-Natriumphosphatpuffer, pH 7,6, 150 ml 2,8 M Glucose und wenige Tropfen Antischaum (Roth) zugegeben. Unter Sauerstoffbelüftung und starkem Rühren wurden die E. coli-Zellen bei 37 °C bis zu einer Konzentration von ca. 6×10^9 Zellen/ml gezogen (spätlogarithmische Phase); dabei wurde der pH-Wert durch Zugabe von 0,4 M NaOH oberhalb 6,5 gehalten und alle 2 Std. 50 ml 2,8 M Glucose nachgegeben. Die abzentrifugierten Zellen (Sorvall GS 3-Rotor, 5 Min., 7.500 Upm, 4 °C) wurden zweimal mit 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, gewaschen und zur Aufbewahrung bei -20 °C eingefroren.

Die Lyse der Zellen wurde ähnlich, wie in Ref. 88 beschrieben, vorgenommen. Dazu wurden je 100 g Zellen (Feuchtgewicht) in 500 ml 0,3 M Saccharose, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, suspendiert (Eisbad). Unter Rühren wurden dann 50 ml frisch angesetzte Lysozymlösung (10 mg/ml in 0,25 M Tris-HCl, pH 8,0) zugegeben, nach 1 Min. 200 ml 0,25 M EDTA, pH 8,0, und nach 15 Min. 50 ml frisch angesetzte 20 %ige SDS-Lösung. Die äußerst viskose, klare Lösung wurde über Nacht in Eis stengelassen und die Hauptmenge der E. coli-DNA mit den Zellmembranen im Beckman Typ 42-Rotor 90 Min. bei 50.000 x g und 0 °C abzentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde mit NaCl auf 1 M gebracht, 3 Std. bei 4 °C stengelassen und ausgefälltes Protein im Sorvall GSA-Rotor 15 Min. bei maximaler Umdrehungszahl abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand mit 3 Volumen 96 %igen Äthanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, Reste von Äthanol im Vakuum abgezogen und die DNA in 200 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA (TE-Puffer) aufgenommen. Nach Zugabe von 215 g CsCl und 15 ml Äthidumbromidlösung (8 mg/ml in TE-Puffer) wurde 60 Std. im Beckman Ti 60-Rotor bei 35.000 Upm und 15 °C zentrifugiert und die obere Bande unter Fluoreszenzkontrolle (bei 360 nm) mit einer Pasteurpipette abgenommen. Nach einer zweiten Zentrifugation wurde die untere Bande (Form I-DNA) abgenommen, Äthidumbromid mit Isopropanol : n-Butanol 1:1 (gesättigt mit 3 M CsCl in TE-Puffer) extrahiert (sechsmal), die DNA gegen TE-Puffer dialysiert und mit CHCl_3 gesättigt im Kühlschrank aufbewahrt.

4.1.3. Präparation von T7-DNA

Die DNA des Phagen T7 wurde nach Ref. 89 isoliert. Die folgenden Angaben gelten für die Aufarbeitung von 10 l Lysat: Das Lysat (E. coli B) wurde 40 Min. bei 7.000 Upm und 4 °C zentrifugiert und die T7-Phagen aus dem Überstand nach Zugabe von NaCl auf 0,5 M mit 600 g Polyäthylenglykol 6.000 bei 4 °C über Nacht gefällt. Die Phagen wurden abzentrifugiert (30 Min., 7.000 Upm), in 500 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl (Puffer T) suspendiert und im Beckman Typ 42-Rotor sedimentiert (1 Std., 32.000 Upm, 4 °C). Zur weiteren Reinigung wurden die Phagen erneut in 30 ml Puffer T suspendiert und pro 1 ml Phagensuspension 0,781 g CsCl zugegeben (n = 1,3825). Nach 60 Std. Zentrifugation im Beckman SW 41-Rotor bei 30.000 Upm und 5 °C wurde die Phagenbande mit einer kleinen Spritze abgenommen und die Phagensuspension gegen 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl dialysiert. Protein wurde bei einer Phagenkonzentration von 60 A₂₆₀-Einheiten/ml zweimal mit Phenol unter Zusatz von 0,1 % SDS extrahiert, die T7-DNA gegen TE-Puffer (4.1.2.) dialysiert und mit CHCl₃ gesättigt bei 4 °C aufbewahrt.

4.1.4. Kalbsthymus-DNA

Kalbsthymus-DNA mit einem Molekulargewicht von etwa 10⁷ wurde von der Firma Boehringer, Mannheim, bezogen.

4.1.5. Konzentrationsbestimmung

DNA-Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt:
1 mg/ml = 20 A₂₆₀-Einheiten/ml.

4.2. Kalbsthymushistonfraktionen

Kalbsthymushistonfraktionen werden heute im wesentlichen nach zwei Methoden isoliert, die sich durch die Art der Chromatindissoziation und die anschließende Fraktionie-

rung der Histone unterscheiden. Nach dem gebräuchlicheren Verfahren werden die Histone mit Säure extrahiert und anschließend durch Fällung mit organischen Lösungsmitteln und Gelchromatographie oder Ionenaustauscherchromatographie getrennt. Eine schonendere Methode dagegen ist die Dissoziation des Chromatins mit Salz und anschließende Fraktionierung der Histone durch Gelchromatographie unter weitgehender Vermeidung denaturierender Bedingungen. In der hier dargestellten Form gab das zweite Verfahren mit geringerem Aufwand reine Histonfraktionen in besserer Ausbeute. Die Reinheit der Histonfraktionen war größer als 95 %.

4.2.1. Säureextrahierte Histone

Kalbsthymus (unmittelbar nach dem Schlachten der Kälber in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt) wurde nach Ref. 90 in 0,15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, unter Zusatz von 0,1 % Oktanol (zur Verhinderung des Schäumens) und 1 mM PMSF (als Proteaseinhibitor; 100 mM-Lösung in Isopropanol) homogenisiert und Chromatin durch Zentrifugation isoliert. Nucleohistone wurden durch einmaliges Waschen mit 0,35 M NaCl extrahiert und die Histone nach "Auflösung" des Nucleohistons in H₂O mit 0,2 N HCl extrahiert (91). Die Aceton-gefällten Histone wurden im Exsikkator bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Die Auftrennung der säureextrahierten Histone wurde, ähnlich wie in Ref. 92, durch fraktionierte Präzipitation mit sauren Aceton-H₂O- und Äthanol-H₂O-Mischungen und Gelchromatographie auf Sephadex G-75, superfine, (statt Biogel P-100) zur Trennung von H₂A und H₄ vorgenommen. Bequemer war die Trennung der säureextrahierten Histone nach Ref. 93 über eine Biogel P-60-Säule bei pH 1,7 (Puffer: 0,1 M NaCl, 0,02 N HCl, 0,02 % NaN₃) und eine Sephadex G-100-Säule bei pH 5,4. Bis auf die Histon-PM2-DNA-Komplexe wurden alle mit einzelnen, säureextrahierten Histonen rekonstituierten Komplexe mit Histonen gebildet, die nach dieser Methode isoliert worden waren.

4.2.2. Salzextrahierte Histone

Tiefgefrorener Kalbsthymus wurde nach Ref. 94 aufgearbeitet und das Desoxyribonukleoprotein zur Entfernung

von Nüchthistonproteinen einmal mit 0,35 M NaCl extrahiert (91). Alle dabei und im folgenden verwendeten Puffer enthielten zusätzlich 1 mM PMSF. 20 g des Desoxyribonukleoproteins (Feuchtgewicht) wurden dann in 500 ml H₂O homogenisiert (Waring Blendor) und in 500 ml 4 M NaCl, 0,05 M Na₂S₂O₅, 0,1 M Natriumacetat, pH 5,0, zur Dissoziation eingeührt.

Die Isolierung der Histone und die Fraktionierung in H₁, (H₃)₂(H₄)₂-Tetramerkomplex (Ref. 6) und (H₂A, H₂B) erfolgte nach Ref. 95. Die Auftrennung der Histone in den Histonkomplexen (H₃)₂(H₄)₂ und (H₂A, H₂B) wurde nach Ref. 93 vorgenommen. Die Histonkomplexe bzw. reinen Histonfraktionen wurden gegen 50 mM Natriumacetat pH 5,0 dialysiert und bei - 20 °C eingefroren.

4.2.3. Konzentrationsbestimmung

Histonkonzentrationen wurden photometrisch bei 275 nm bestimmt mit den Extinktionskoeffizienten $4,05 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (H₂A), $6,7 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (H₂B), $4,04 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (H₃) und $5,4 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (H₄) aus Ref. 4 sowie der in Ref. 91 angegebenen Extinktion für 1 mg H₁/ml von 0,18.

4.3. Präparation von Kalbsthymuszellkernen und Chromatin

4.3.1. Kalbsthymuszellkerne

Kalbsthymuszellkerne wurden bei 0 - 4 °C in modifizierter Form nach Ref. 96 präpariert. Dazu wurden 7 g tiefgefrorener Kalbsthymus (-80 °C) in 50 ml 0,25 M Saccharose, TKC-Puffer, 0,2 % Triton X-100, 1 mM PMSF im Potter-Elvehjem-Homogenisator suspendiert und zweimal durch vier Lagen ausgekochten Verbandsmüll filtriert (TKC-Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 25 mM KCl, 5 mM CaCl₂). 40 ml des Homogenats wurden mit 80 ml 2,3 M Saccharose, TKC-Puffer, 0,2 % Triton X-100, 1 mM PMSF gut vermischt und, auf vier Zellulosenitratröhrchen verteilt, über je 10 ml 2,3 M Saccharose, TKC-Puffer, 1 mM PMSF geschichtet und 1 Std. im Beckman SW 27-Rotor bei

26.000 Upm und 0 °C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellkerne wurden einmal mit 20 ml 0,25 M Saccharose, TKC-Puffer, 1 mM PMSF und einmal mit 20 ml Puffer A (Ref. 18: 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0,15 mM Spermin-Cl₄, 0,5 mM Spermidin-Cl₃, 15 mM Dithiothreitol, 15 mM Tris-HCl, pH 7,4), 0,2 mM EDTA, 1 mM PMSF gewaschen und in 20 ml Puffer A, 0,2 mM EDTA, 1 mM PMSF resuspendiert. Zum Waschen wurden die Zellkerne jeweils im Potter-Elvehjem-Homogenisator resuspendiert und danach 5 Min. im Sorvall SS 34-Rotor bei 2.000 Upm und 0 °C abzentrifugiert. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 1.000 A₂₆₀-Einheiten (gemessen in 5 M Harnstoff, 2 M NaCl). Die Zellkernpräparationen wurden im Mikroskop kontrolliert und grundsätzlich sofort weiterverarbeitet.

4.3.2. Kalbsthymuschromatin

Kalbsthymuschromatin wurde durch partiellen Abbau von Zellkernen mit Mikrokokkus-Nuklease in modifizierter Form nach Ref. 19 und 55 präpariert. Der partielle Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease ersetzt das zur Zerkleinerung des Chromatins bisher gebräuchliche Scheren und ergibt eine Chromatinpräparation, die nach Ref. 55 als nativ bezeichnet werden kann.

In einem typischen Ansatz wurden 600 A₂₆₀-Einheiten Kalbsthymuszellkerne in 60 ml Puffer A (4.3.1.), 0,2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM CaCl₂ bei 37 °C mit 3 U/ml Mikrokokkus-Nuklease 4 Min. inkubiert, der Abbau mit 0,6 ml 0,2 M EDTA gestoppt und die Kerne nach Abkühlung in Eis 5 Min. bei 4.000 x g abzentrifugiert. Die Kerne wurden in 10 ml 0,2 mM EDTA, 1 mM PMSF unter Benutzung einer Pasteurpipette lysiert, 3 Min. bei 4.000 x g zentrifugiert und der Niederschlag mit 5 ml 0,2 mM EDTA, 1 mM PMSF reextrahiert. Von jeweils zwei Inkubationsansätzen wurden die Überstände vereinigt, die das durch den partiellen Abbau "löslich" gewordene Chromatin enthielten (unter den angegebenen Bedingungen ca. 20 % des eingesetzten Chromatins), und auf einer Biogel A 50 m-Säule fraktioniert, um kleinere Chromatinfragmente abzutrennen (Säulendimensionen: 3 x 90 cm; Puffer: 10 mM Tris-Kacodylat, pH 7,0, 0,7 mM EDTA, 1 mM PMSF; Elutionsgeschwindigkeit 20 ml/Std.; Fraktionsvolumen: 3,5 ml). Verwendet wurden die Fraktionen, die Chromatin enthielten, dessen DNA etwa zwischen 3.000 - 30.000 Np groß war (ca. 60 % des "löslichen" Chromatins).

4.3.3. H1-freies Kalbsthymuschromatin

Die Extraktion von H1 aus Chromatin erfolgte mit NaCl nach Ref. 97 ähnlich wie in Ref. 15 beschrieben: 13,5 A₂₆₀-Einheiten des nach 4.3.2. präparierten Chromatins wurden in 27 ml Puffer (Puffer der Biogel A 50 m-Säule, 4.3.2.) im Eisbad unter Rühren mit NaCl auf 0,63 M versetzt und 3 Std. bei 0 °C gehalten. Zur Abtrennung von H1 wurde das partiell dissoziierte Chromatin, auf drei Röhrchen verteilt, über diskontinuierliche Glycerin-Gradienten geschichtet (je 0,5 ml 85 % Glycerin, Puffer; 2 ml 50 % Glycerin, Puffer, 0,6 M NaCl; 2 ml 20 % Glycerin, Puffer, 0,6 M NaCl. Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,2 mM EDTA, 1 mM PMSF) und 14 Std. im Beckman SW 41-Rotor bei 38.000 Upm und 0 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Röhrchen von oben her in 1 ml-Fraktionen ausgepumpt und die Absorption bei 260 nm in den Fraktionen gemessen. Das H1-freie Chromatin, das sich als homogene Fraktion in der 85 % Glycerin-Phase befand, wurde gegen 10 mM Tris-Kakodylsäure, pH 7,0, 0,7 mM EDTA, 1 mM PMSF dialysiert.

4.4. Rekonstitution der Histon-DNA-Komplexe

Die Methoden zur Dissoziation und Rekonstitution von Nukleohistonkomplexen lassen sich in zwei Gruppen einteilen, die sich durch die Anwesenheit (79, 98, 99) oder Abwesenheit (7, 15, 60, 61) von Harnstoff unterscheiden. Außer mit Histonen wurden auch Komplexe mit Polylysine und Polyarginin (Sigma) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 30.000 bzw. 58.000 rekonstituiert.

4.4.1. Kontinuierlicher Salz-Harnstoff-Gradient

PM2-DNA-Histon-Komplexe wurden mit NaCl und Harnstoff bei 4 °C rekonstituiert. Die Komplexe wurden in 2 M NaCl, 5 M Harnstoff, 0,25 mM EDTA, pH 7,0 gemischt (DNA-Konzentration während der Rekonstitution 4 - 5 A₂₆₀-Einheiten/ml; pro Versuch wurden 1 - 2 A₂₆₀-Einheiten eingesetzt) und zunächst 6 Std. gegen den gleichen Puffer dialysiert. Dann wurde NaCl herausverdünnt, in dem zu 500 ml des Mischpuffers kontinuierlich über 48 Std. 5 l 2,5 mM NaCl, 5 M

Harnstoff, 0,25 mM EDTA, pH 7,0 , zugepumpt wurden. Dabei wurde das Volumen des Mischpuffers konstant gehalten. Anschließend wurde Harnstoff über 24 Std. mit 5 l 2,5 mM NaCl, 0,25 mM EDTA, pH 7,0 , herausverdünnt und zum Schluß noch einmal über Nacht gegen diesen Puffer dialysiert.

4.4.2. Diskontinuierlicher Salz-Harnstoff-Gradient

Je 50 μ g DNA wurden mit Histonen (0 - 50 μ g) in kleinen Dialyseschläuchen in einem Endvolumen von 0,35 ml 5 M Harnstoff, 3 M NaCl, Puffer gemischt und bei 4 °C gegen Puffer mit: 5 M Harnstoff, 3 M NaCl (8 Std.), 5 M Harnstoff, 0,6 M NaCl (16 Std.), 0,6 M NaCl (8 Std.) und zum Schluß 16 Std. gegen Puffer dialysiert. Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 , 1 mM β -Mercaptoäthanol, 1 mM PMSF.

4.4.3. Diskontinuierlicher Salz-Gradient, 4 °C

Histone wurden zusammenpipettiert (0 - 150 μ g) und im Endvolumen von 1 ml 2 M NaCl, Puffer mit je 50 μ g DNA gemischt. Bei 4 °C wurde gegen jeweils 1 l Puffer mit: 2 M NaCl (8 Std.), 1,5 M NaCl (16 Std.), 1 M NaCl (8 Std.), 0,75 M NaCl (16 Std.), 0,5 M NaCl (8 Std.), 0,4 M NaCl (16 Std.), 0,1 M NaCl (8 Std.) und zum Schluß 16 Std. gegen Puffer dialysiert. Puffer: 15 mM NaCl, 0,1 mM CaCl_2 , 1 mM β -Mercaptoäthanol, 1 mM PMSF, 15 mM Kaliumphosphat, pH 7,3 .

4.4.4. Diskontinuierlicher Salz-Gradient, 37 °C

Nach dieser Methode wurde wie unter 4.4.3. beschrieben rekonstituiert. Statt bei 4 °C wurde jedoch bei 37 °C je 1 Std. gegen jede Salzlösung dialysiert.

4.4.5. Chromatin mit reassoziiertem H1

Nach 4.3.2. präpariertes Kalbsthymuschromatin (0,75 A₂₆₀-Einheiten/ml) wurde 3 Std. bei 0 °C in 0,63 M NaCl zur Dissoziation von H1 stehengelassen und zur Reassoziaton von H1 anschließend bei 4 °C gegen Puffer mit 0,5 M NaCl (16 Std.), mit 0,4 M NaCl (2 Std.), mit 0,1 M NaCl (2 Std.) und zum Schluß 3 Std. gegen Puffer (10 mM Tris-Kakodylat, pH 7,0 , 0,7 mM EDTA, 1 mM PMSF) dialysiert.

4.4.6. Chromatin mit rekonstituiertem H1

Nach 4.3.3. präpariertes H1-freies Kalbsthymuschromatin (0,75 A₂₆₀-Einheiten/ml) wurde mit NaCl ad 0,63 M versetzt und zu je 1,5 A₂₆₀-Einheiten wurden 12,1 µg H1 (≅ 1 Molekül H1 pro 200 Np DNA) bzw. 18,2 µg H1 (≅ 1,5 Moleküle H1 pro 200 Np DNA) unter Rühren zugegeben. Nach 3 Std. Stehenlassen in Eis wurde, wie für Chromatin mit reassoziiertem H1 angegeben, dialysiert.

4.5. Abbau mit Nukleasen

Restriktionsnukleasen Hind II und Hind III aus *Hämophilus influenzae* wurden von P. Philippsen und R. E. Streeck nach Ref. 40, Restriktionsnuklease Bsu aus *Bazillus subtilis* von W. Hörz nach Ref. 100 gereinigt und zur Verfügung gestellt. Einheiten der Hind-Enzyme, wenn angegeben, wurden nach Ref. 40 bestimmt. DNAase I aus Rinderpankreas (E.C. 3.1.4.5.), DNAase II aus Schweinemilz (E.C. 3.1.4.6.) und Mikrokokkus-Nuklease aus *Staphylokokkus aureus* (E.C. 3.1.4.7.) wurden von der Firma Worthington (New Jersey, USA) gekauft. Einheiten der Mikrokokkus-Nuklease wurden nach Ref. 101 bestimmt.

Inkubationsbedingungen sind in den Legenden der Abbildungen angegeben. Nach dem Abbau mit Nukleasen wurden die Nukleohistonkomplexe zum Abbau der Proteine, ähnlich wie in Ref. 102 angegeben, mit EDTA, SDS und Proteinase K (E. Merck, Darmstadt) auf die Endkonzentrationen 10 mM, 0,2 % und 0,1 mg/ml versetzt und mindestens 3 Std. bei 37 °C inkubiert. Zur Extraktion der abgebauten Proteine wurden NaClO₄ ad 1 M und 0,5 Volumen Phenol(gesättigt mit 1 M NaClO₄) zugegeben und 5 Min. geschüttelt. Nach Zugabe

von 0,5 Volumen CHCl_3 /Isoamylalkohol 24/1, Schütteln und Zentrifugation wurde die organische Phase abgenommen und die DNA mit 2,5 Volumen 96 %igem Äthanol gefällt (über Nacht, -20°C). Die DNA wurde einmal mit 70 %igem Äthanol gewaschen, Äthanol im Vakuum abgezogen, die DNA wie in den Legenden der Abbildungen angegeben gelöst und zur elektrophoretischen Auftrennung auf die Gele aufgetragen. Rekonstituierte Komplexe wurden nach Restriktionsnuklease-Spaltungen auch ohne Proteinase K-Behandlung mit einem Überschuß EDTA gestoppt und sofort mit SDS (1 %), Phenol und CHCl_3 /Isoamylalkohol, wie oben beschrieben, extrahiert.

4.6. Gelelektrophorese

4.6.1. Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophoresen wurden mit ($1\text{ }\mu\text{g/ml}$) und ohne Äthidiumbromid im Gel und im Puffer ähnlich wie in Ref. 103 durchgeführt. Die Agarosekonzentration wurde je nach Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente von 0,6 bis 3,5 % variiert. Für Plattengele wurde immer SeaKem Agarose (Marine Colloids, Rockland, Maine 04841) verwendet, während Rundgele auch mit Agarose gegossen wurden, die von der Firma Behringwerke bezogen wurde. Verwendete Puffer waren:

TEB-Puffer (104): 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, ergibt pH 8,3

TEP-Puffer (105): 36 mM Tris, 30 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA, ergibt pH 7,7 - 7,8

Agarose-SDS-Gelelektrophoresen wurden in TEB-Puffer vorgenommen, der zusätzlich 0,1 % SDS enthielt. Vor dem Färben der Gele wurde das SDS dreimal je 3 Std. mit 1 mM EDTA, pH 7, eluiert.

Agarosegele, die ohne Äthidiumbromid in der Elektrophorese verwendet wurden, wurden nach dem Lauf mit $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ Äthidiumbromid in 1 mM EDTA, pH 7,0, 30 Min. gefärbt. Die gefärbten Gele wurden unter ultravioletem Licht (Auflicht bzw. Durchlicht) betrachtet. Fotografiert wurden die Gele durch einen Rotfilter mit einem Ilford HP4-Kleinbilddfilm bzw. zur Auswertung der Gele mit einem graphischen Film unter Verwendung einer Plattenkamera wie in Ref. 106 angegeben. Die Negative wurden mit einem umgebauten PL 4 Zeiss-Photometer densitometriert.

Zur direkten Densitometrie von Agarose-Rundgelen (Elektrophorese von H1-PM2-DNA-Komplexen; 2.1.1.2.) wurden die Gele nach der Elektrophorese (ohne Äthidiumbromid) mit "stains all" (Serva) nach Ref. 107 bzw. selektiv auf Protein mit Coomassie Brilliantblau G-250 (Serva) nach Ref. 108, jedoch mit 0,14 M NaCl statt Essigsäure, gefärbt.

4.6.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

λ dv 21-DNA-Fragmente wurden in 4 %igen Acrylamid-Plattengelen elektrophoretisch aufgetrennt (40), die Gele nach Anfärbung mit Toluidinblau mit einem Agfaortho 25 professional-Film fotografiert und bei 546 nm densitometriert.

DNA-Fragmente, die nach Abbau von Histon-DNA-Komplexen mit Mikrokokkus-Nuklease erhalten wurden, wurden - soweit nicht in Agarose-Plattengelen - in 6 %igen Acrylamid-Plattengelen nach Ref. 59 mit einem 4 %igen Sammelgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Pufferkonzentration im Sammelgel war um den Faktor zehn geringer als die Pufferkonzentration im Trenngel. Einzelsträngige DNA wurde auf 6 %igen Acrylamid-Plattengelen nach Ref. 63 analysiert. Nach der Elektrophorese wurden die Polyacrylamidgele mit Äthidiumbromid gefärbt, fotografiert und die Negative densitometriert wie für Agarosegele beschrieben.

Histone wurden entweder auf 15 %igen Acrylamid-Rundgelen nach Ref. 109 oder auf 18 %igen Acrylamid-Plattengelen nach Ref. 65 analysiert. Die Plattengele wurden nach Ref. 110 gefärbt und bei 578 nm densitometriert.

4.7. Quantifizierung des Schutzes von Hind II-Spaltstellen auf der λ dv 21-DNA

Die Identifizierung der λ dv 21-Hind II-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung erfolgte über die Molekulargewichte der Fragmente (Abb. 5) und ihre entsprechenden elektrophoretischen Beweglichkeiten. Um den Schutz bestimmter Spaltstellen durch Histone quantitativ auszuwerten, wurden Densitogramme der Gele aufgenommen und die Flächen unter den Gipfeln planimetrisch bestimmt.

Durch Division der Fläche durch das Molekulargewicht des entsprechenden Fragments erhielt man dessen molare Menge. Das Ausmaß des Schutzes einer bestimmten Spaltstelle wurde dann nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Schutz einer Spaltstelle (\%)} = \frac{100 A}{A + 0,5 B}$$

wobei A = Summe der molaren Mengen aller Fragmente, die nach der Inkubation die Spaltstelle noch enthielten,

und B = Summe der molaren Mengen aller Fragmente, die durch Spaltung an der Stelle entstanden waren.

Dadurch wurde über die molaren Mengen der Fragmente - jeweils für eine bestimmte Spaltstelle - der Quotient aus der Zahl der ungespaltenen Stellen und der Gesamtzahl der Spaltstellen bestimmt. Dieser Quotient, in Prozent ausgedrückt, gibt den Schutz einer bestimmten Spaltstelle an.

4.8. Kettenlängenbestimmung der DNA-Fragmente

Kettenlängen von DNA-Fragmenten wurden durch Koelektrophorese mit Fragmenten bekannter Größe in Agarosegelen (ohne Äthidiumbromid) über eine Eichkurve bestimmt. Dazu wurde der Logarithmus der Kettenlängen (Nukleotidpaare) gegen die Laufstrecke im Gel aufgetragen (vgl. Abb. 15). Zur Eichung wurden die Restriktionsfragmente einer λ dv 1-Bsu-Spaltung benutzt, deren Größen mit Hilfe der in Ref. 16 angegebenen Kettenlängen der PM2-Hae III-Fragmente bestimmt wurden. Dazu wurden die Fragmente einer λ dv 1- und einer PM2-Bsu-Spaltung (Bsu ist ein Isoschizomer zu Hae III) gemischt, elektrophoretisch aufgetrennt und über eine mit Hilfe der PM2-Fragmente konstruierte Eichkurve die Kettenlängen der λ dv 1-Bsu-Fragmente bestimmt. Sie betrugen: (A) 1730, (B) 1330, (C) 890, (D) 525, (E) 456, (F, G) 358, (H) 272, (I) 223, (K, L) 212, (M) 175, (N) 142, (O) 130 und (P) 80 Np.

Von R.E. Streeck unabhängig bestimmte Kettenlängen der λ dv 1-Bsu-Fragmente A - M, die auf das von W. Fiers sequenzierte H-Fragment der SV 40-Hind II + III-Spaltung mit 267 Np + 4 N = 269 Np und Restriktionsfragmente der Satelliten-DNAs aus Maus- und BS-C-1-Zellen bezogen wurden; stimmten auf ± 2 % mit den oben angegebenen Werten überein.

4.9. Isolierung rekonstituierter Nukleosomenkerne

Zur Isolierung diskreter Untereinheiten wurde zunächst ein Komplex aus 10 mg Kalbsthymus-DNA und je 4,5 mg (H2A, H2B) und (H3)₂(H4)₂, wie unter 4.4.3. beschrieben, rekonstituiert und anschließend in einer Konzentration von 1 A₂₆₀-Einheiten/ml bei 30 °C mit 1 U/ml Mikrokokkus-Nuklease 17 Min. inkubiert. Der Abbau wurde durch Zugabe von EDTA ad 1 mM gestoppt, der Inkubationsansatz gegen 1 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF dialysiert und schonend auf ca. 30 ml konzentriert, indem mit Hilfe von trockenem Sephadex G-100, das außen auf die Dialyserschläuche gestreut wurde, das Volumen der Lösung im Schlauch eingeengt wurde. Je 2 ml des Konzentrats wurden auf 34 ml eines isokinetischen Saccharose-Gradienten (111) mit $c_{mix} = 5\%$, $c_r = 28,8\%$ und $v_m = 201$ ml in 1 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF aufgetragen und 24 Std. bei 27.000 Upm und 3 °C im Beckman SW 27-Rotor zentrifugiert. Um die Absorptionsprofile aufzunehmen, wurden die Gradienten nach dem Lauf durch eine Durchflußküvette gepumpt. Aufgefangen wurden 0,5 ml Fraktionen. Fraktionen, die aufgrund der Länge der DNA Nukleosomenkerne enthielten, wurden gesammelt und rezentrifugiert.

4.10. Bestimmung der Sedimentationskonstanten rekonstituierter Nukleosomenkerne

Die Sedimentationskonstante rekonstituierter Nukleosomenkerne wurde in einer analytischen Ultrazentrifuge (Beckman, Modell E) nach der Sedimentationsgeschwindigkeitsmethode ("moving boundary") bestimmt. 0,25 A₂₆₀-Einheiten wurden in 0,45 ml 10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF bei 36.000 Upm und 4 °C zentrifugiert und die Sedimentation der Untereinheiten mit einem "UV-scanner" bei 260 nm verfolgt. Der gefundene S-Wert wurde auf den S_{20,W}-Wert umgerechnet.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wird die Spezifität der Bindung von Histonen an DNA mit Hilfe von Restriktionsnukleasen und die Rekonstitution von Nukleosomen und Nukleosomenkernen mit Hilfe unspezifischer Nukleasen untersucht. Eingehende Versuche gelten der Rolle des Histons H1, das am Aufbau der Nukleosomenkerne nicht beteiligt, aber für die Ausbildung einer Überstruktur der Nukleosomenkette verantwortlich ist.

Die Frage nach einer möglichen Sequenzspezifität der Histon-DNA-Bindung wird an Komplexen aus Kalbsthymushistonen und der Plasmid-DNA λ dv 21 untersucht. Dabei zeigt sich, daß von den fünf Spaltstellen für die Restriktionsnuklease Hind II auf λ dv 21-DNA zwei bevorzugt gegen Spaltung durch die Nuklease geschützt werden, unabhängig davon, ob zur Komplexbildung lineare oder "superhelikale" DNA eingesetzt wird. Eine solche Spezifität der Bindung von Histonen an bestimmte DNA-Sequenzen wird jedoch immer nur dann beobachtet, wenn Komplexe mit einzelnen Histonen allein rekonstituiert werden. Dagegen wird in Komplexen, die aus einem Gemisch der vier Histone H2A, H2B, H3 und H4 und λ dv 21-DNA rekonstituiert werden, ein gleichmäßiger Schutz aller fünf Spaltstellen gefunden. Das bedeutet, daß durch die Bildung von Nukleosomenkernen, die unter diesen Bedingungen entstehen (siehe unten), eine präferentielle Bindung von Histonen an bestimmte DNA-Sequenzen aufgehoben wird. Es ist anzunehmen, daß Konformationsänderungen der Histone im Nukleosomenkern zur unspezifischen Wechselwirkung mit der DNA führen.

Komplexe, die aus DNA und dem Gemisch der erwähnten vier kleinen Kalbsthymushistone rekonstituiert werden, enthalten partikuläre Untereinheiten wie unmittelbar durch

Elektronenmikroskopie und indirekt durch Abbau mit unspezifischen Nukleasen nachgewiesen wird. In Übereinstimmung mit den Arbeiten anderer Autoren zeigt sich hierbei, daß zur Bildung der Untereinheiten alle vier Histone, jedoch kein H1, benötigt werden. Die Herkunft der DNA spielt keine Rolle; prokaryontische DNA, die "in vivo" nicht mit Histonen assoziiert ist, eignet sich ebenso gut wie die homologe Kalbsthymus-DNA. Neu ist der Nachweis, daß es sich bei den Untereinheiten um aneinandergereihe Nukleosomenkerne handelt. Dies ergibt sich aus der Einheitslänge von 137 ± 7 Np der durch Abbau mit Mikrokokkus-Nuklease entstandenen DNA-Fragmente wie auch der weitergehenden Charakterisierung isolierter Untereinheiten durch Sedimentationskonstante, Histonzusammensetzung, DNA-Gehalt und Fragmentierungsmuster nach Abbau mit DNAase I.

Aneinandergereihe Nukleosomenkerne im Raster von ca. 140 Np DNA lassen sich auch durch Extraktion von Kalbsthymuschromatin mit 0,63 M NaCl erhalten. Diese Extraktion hat nicht nur den selektiven Verlust von H1 zur Folge, sondern überführt auch - wie der Abbau des H1-freien Chromatins durch Mikrokokkus-Nuklease und DNAase II zeigt - das 200 Np-Raster der Nukleosomen in ein 140 Np-Raster von Nukleosomenkernen. Das bedeutet, daß Nukleosomenkerne auf der DNA "zusammenrutschen" können. Es ist anzunehmen, daß das Gleiten der Histonkomplexe entlang der DNA durch Lockerung der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen den Histonen und der DNA aufgrund der höheren Ionenstärke ermöglicht wird. Wie der Abbau des H1-freien Chromatins mit DNAase I zeigt, wird die Anordnung der DNA in den Nukleosomenkernen hierdurch nicht verändert.

Trotz umfangreicher Rekonstitutionsversuche gelingt es nicht, aus DNA und einem Gemisch aller fünf Histone

(und Nichthistonproteinen) aneinandergereihte Nukleosomen mit einem DNA-Gehalt von 200 Np pro Untereinheit zu rekonstituieren. Auch in diesem Fall entstehen überwiegend Nukleosomenkerne im Raster von ca. 140 Np. Die Anwesenheit von H1 führt jedoch in einigen Untereinheiten zum zusätzlichen Schutz von ca. 35 Np DNA. Ein entsprechendes Fragment von ca. 175 Np wird auch beim Abbau von Kalbsthymuszellkernen erhalten. Im H1-freien Chromatin werden Nukleosomenkerne im Raster von 140 Np durch Zugabe von H1 nicht in ein Nukleosomenraster von 200 Np "zurückgeschoben". Eine mögliche Erklärung für diese Befunde ist, daß H1 zwar an DNA bindet, jedoch keine Wechselwirkung mit dem Histonkomplex im Nukleosomenkern zeigt.

In Übereinstimmung mit den Befunden einer Reihe von Autoren sprechen die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse dafür, daß H1 im Nukleosom ein bestimmtes DNA-Segment schützt, das zusätzlich zu den 140 Np pro Nukleosomenkern in der Chromatinuntereinheit gebunden ist. H1 besitzt möglicherweise die Aufgabe, die Nukleosomenkette in eine Überstruktur zu ordnen. Dafür spricht der elektronenmikroskopische Befund anderer Autoren, die gezeigt haben, daß die Faltung der Nukleosomenkette zu einer "Superhelix" (Solenoid) an die Anwesenheit von H1 und Mg^{2+} gebunden ist. In dieser Arbeit wird der Einfluß von divalenten Kationen und H1 auf die Chromatinstruktur mit Hilfe von DNAase II untersucht, die - wie in unserem Labor gezeigt wurde - in Maus- und Rattenleberzellkernen nicht nur im internukleosomalen Bereich sondern mit gleicher Wahrscheinlichkeit auch an einer intranukleosomalen Stelle spalten kann. Abbau von Kalbsthymuszellkernen und Chromatin durch DNAase II in Gegenwart divalenter Kationen führt ebenfalls zu einem DNA-Fragmentmuster, das durch gleichmäßige Spaltung an diesen Stellen zu erklären ist. Dagegen spaltet DNAase II mit deutlicher Präferenz im in-

ternukleosomalen Bereich, wenn Kalbsthymuschromatin in Gegenwart von EDTA oder H¹-freies Chromatin in Gegenwart von EDTA oder divalenten Kationen inkubiert werden. Es ist anzunehmen, daß die Veränderungen in der Zugänglichkeit der inter- und intranukleosomalen Spaltstellen für DNAase II eine Folge der helikalen Anordnung der Nukleosomen im Solenoid sind und durch H¹-DNA-Wechselwirkungen in Gegenwart divalenter Kationen bestimmt werden.

Die Versuche tragen zur Charakterisierung der Chromatinstruktur bei, deren genaue Kenntnis eine Voraussetzung dafür darstellt, den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion im Chromatin zu verstehen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 S.C.R. Elgin und H. Weintraub, Ann. Rev. Biochemistry 44, 725 - 774 (1975)
- 2 E.M. Bradbury, in: The Structure and Function of Chromatin, CIBA Foundation Symposium No. 28, 1 - 4 (Elsevier, Amsterdam, 1975)
- 3 A.L. Olins, J.P. Breillat, R.D. Carlson, M.B. Senior, E.B. Wright und D.E. Olins (1976), in: The Molecular Biology of the Mammalian Genetic Apparatus, Teil A (Hrsg. P.O.P. T'so), (Elsevier / North Holland, Amsterdam, im Druck)
- 4 J.A. D'Anna, Jr., und I. Isenberg, Biochemistry 13, 4992 - 4997 (1974)
- 5 J.A. D'Anna, Jr., und I. Isenberg, Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 343 - 347 (1974)
- 6 R.D. Kornberg und J.O. Thomas, Science 184, 865 - 868 (1974)
- 7 R.D. Kornberg, Science 184, 868 - 871 (1974)
- 8 K.E. van Holde, C.G. Sahasrabudde und B.R. Shaw, Nucleic Acids Res. 1, 1579 - 1586 (1974)
- 9 B. Lewin, Nature 254, 651 - 653 (1975)
- 10 G.B. Kolata, Science 188, 1097 - 1099 (1975)
- 11 G. Felsenfeld, Nature 257, 177 - 178 (1975)
- 12 E.M. Bradbury, Trends in Biochem. Sciences 1, 7 - 9 (1976)
- 13 C.L.F. Woodcock, J. Cell Biol. 59, 368a (1973)
- 14 A.L. Olins und D.E. Olins, Science 183, 330 - 332 (1974)
- 15 P. Oudet, M. Gross-Bellard und P. Chambon, Cell 4, 281 - 300 (1975)
- 16 M. Noll, Cell 8, 349 - 355 (1976)
- 17 D.R. Hewish und L.A. Burgoyne, Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 504 - 510 (1973)
- 18 M. Noll, Nature 251, 249 - 251 (1974)
- 19 B.R. Shaw, J.L. Cordon, C.G. Sahasrabudde und K.E. van Holde, Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 1193 - 1198 (1974)
- 20 L.A. Burgoyne, D.R. Hewish und J. Mobbs, Biochem. J. 143, 67 - 72 (1974)

- 21 K.E. van Holde, C.G. Sahasrabuddhe, B.R. Shaw, E.F.J. van Bruggen und A.C. Arnberg, Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 1365 - 1370 (1974)
- 22 J.T. Finch, M. Noll und R.D. Kornberg, Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 72, 3320 - 3322 (1975)
- 23 J.F. Pardon, D.L. Worcester, J.C. Wooley, K. Tatchell, K.E. van Holde und B.M. Richards, Nucleic Acids Res. 2, 2163 - 2176 (1975)
- 24 F.H.C. Crick und A. Klug, Nature 255, 530 - 533 (1975)
- 25 L. Sperling und A. Tardieu, FEBS Lett. 64, 89 - 91 (1976)
- 26 M.H. Wigler und R. Axel, Nucleic Acids Res. 3, 1463 - 1471 (1976)
- 27 J.L. Compton, R. Hancock, P. Oudet und P. Chambon, Eur. J. Biochem. 70, 555 - 568 (1976)
- 28 T. Barrett, Nature 260, 576 - 578 (1976)
- 29 E.M. Bradbury, R.J. Inglis und H.R. Matthews, Nature 247, 257 - 261 (1974)
- 30 G.H. Dixon, in: Organization and Expression of Chromosomes (Report of the Dahlem Conference Workshop, Hrsg. V.G. Allfrey, E.K.F. Bautz, B.J. McCarthy, R.T. Schimke und A. Tissières), 197 - 207 (Berlin: Dahlem Konferenzen 1976)
- 31 M. Leng und G. Felsenfeld, Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 56, 1325 - 1332 (1966)
- 32 R.J. Clark und G. Felsenfeld, Nature new Biol. 240, 226 - 229 (1972)
- 33 J.C. Hwan, I.M. Leffak, H.J. Li, P.C. Huang und C. Mura, Biochemistry 14, 1390 - 1396 (1975)
- 34 V.G. Allfrey, in: Histones and Nucleohistones (Hrsg. D.M.P. Phillips), 241 - 249 (Plenum, London und New York, 1971)
- 35 D. Nathans und H.O. Smith, Ann. Rev. Biochemistry 44, 273 - 293 (1975)
- 36 J.P. Baldwin, E.M. Bradbury, G.S. Butler-Browne und R.M. Stephens, FEBS Lett. 34, 133 - 136 (1973)
- 37 R.C. Rubin und E.N. Moudrianakis, J. Mol. Biol. 67, 361 - 374 (1972)
- 38 R.T. Espejo, E.S. Canelo und R.L. Sinsheimer, Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 63, 1164 - 1168 (1969)
- 39 H.B. Gray, Jr., D.A. Ostrander, J.L. Hodnett, R.J. Legerski und D.L. Robberson, Nucleic Acids Res. 2, 1459 - 1491 (1975)

- 40 P. Philippsen, R.E. Streeck und H.G. Zachau, Eur. J. Biochem. 45, 479 - 488 (1974)
- 41 W.W. Dean, B.M. Dancis und C.A. Thomas, Jr., Anal. Biochem. 56, 417 - 427 (1973)
- 42 C. Brack, H. Eberle, T.A. Bickle und R. Yuan, J. Mol. Biol. 104, 305 - 309 (1976)
- 43 R. Ziccardi und V. Schumaker, Biochemistry 12, 3231 - 3235 (1973)
- 44 E.W. Johns und S. Forrester, Biochem. Biophys. Acta 209, 54 - 57 (1970)
- 45 E.M. Bradbury, S.E. Danby, H.W.E. Rattle und V. Giannotti, Eur. J. Biochem. 57, 97 - 105 (1975)
- 46 J.D. McGhee und J.D. Engel, Nature 254, 449 - 450 (1975)
- 47 H.O. Smith und K. Wilcox, J. Mol. Biol. 51, 379 - 391 (1970)
- 48 D.E. Olins und A.L. Olins, J. Cell Biol. 53, 715 - 736 (1972)
- 49 K. Matsubara und A.D. Kaiser, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 769 - 775 (1968)
- 50 R.E. Streeck und G. Hobom, Eur. J. Biochem. 57, 595 - 606 (1975)
- 51 G. Hobom und D.S. Hogness, J. Mol. Biol. 88, 65 - 87 (1974)
- 52 T. Moss, P.D. Cary, C. Crane-Robinson und E.M. Bradbury, Biochemistry 15, 2261 - 2267 (1976)
- 53 A. Walz und V. Pirodda, Nature 254, 118 - 121 (1975)
- 54 T. Maniatis, A. Jeffrey und D.G. Kleid, Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 72, 1184 - 1188 (1975)
- 55 M. Noll, J.O. Thomas und R.D. Kornberg, Science 187, 1203 - 1206 (1975)
- 56 M. Noll, Nucleic Acids Res. 1, 1573 - 1578 (1974)
- 57 R.D. Camerini-Otero, B. Sollner-Webb und G. Felsenfeld, Cell 8, 333 - 347 (1976)
- 58 B. Sollner-Webb, R.D. Camerini-Otero und G. Felsenfeld, Cell 9, 179 - 193 (1976)
- 59 H. Weintraub, K. Palter und F. van Lente, Cell 5, 85 - 110 (1975)
- 60 P.G. Boseley, E.M. Bradbury, G.S. Butler-Browne, B.G. Carpenter und R.M. Stephens, Eur. J. Biochem. 62, 21 - 31 (1976)
- 61 M. Yaneva, E. Tasheva und G. Dessev, FEBS Lett. 70, 67 - 70 (1976)

- 62 R.D. Kornberg, in: Organization and Expression of the Eukaryotic Genome, Proc. 10th FEBS Meeting, Vol. 38 (Hrsg. G. Bernardi und F. Gros), 73 - 79 (North Holland / American Elsevier, 1975)
- 63 R.T. Simpson und J.P. Whitlock, Jr., Nucleic Acids Res. 2, 117 - 127 (1976)
- 64 J.P. Whitlock, Jr., und R.T. Simpson, Nucleic Acids Res. 3, 2255 - 2266 (1976)
- 65 J.O. Thomas und R.D. Kornberg, Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2626 - 2630 (1975)
- 66 W. Altenburger, W. Hörz und H.G. Zachau, Nature 264, 517 - 522 (1976)
- 67 H.G. Zachau, W. Altenburger, W. Greil, W. Hörz und T. Igo-Kemenes (1976), in: International Symposium on the Organization and Expression of the Eukaryotic Genome (Hrsg. E.M. Bradbury und K. Javaherian), (Academic Press, New York, im Druck)
- 68 J.O. Thomas und V. Furber, FEBS Lett. 66, 274 - 280 (1976)
- 69 N.R. Morris, Cell 8, 357 - 363 (1976)
- 70 C. Spadafora, M. Bellard, J.L. Compton und P. Chambon, FEBS Lett. 69, 281 - 285 (1976)
- 71 B. Sollner-Webb und G. Felsenfeld, Biochemistry 14, 2915 - 2920 (1975)
- 72 A.J. Varshavsky, V.V. Bakayev und G.P. Georgiev, Nucleic Acids Res. 3, 477 - 492 (1976)
- 73 B.R. Shaw, T.M. Herman, R.T. Kovacic, G.S. Beaudrean und K.E. van Holde, Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 73, 505 - 509 (1976)
- 74 J.P. Whitlock, Jr., und R.T. Simpson, Biochemistry 15, 3307 - 3314 (1976)
- 75 M. Noll, in: Organization and Expression of Chromosomes (Report of the Dahlem Conference Workshop, Hrsg. V.G. Allfrey, E.K.F. Bautz, B.J. McCarthy, R.T. Schimke und A. Tissières), 239 - 252 (Berlin: Dahlem Konferenzen 1976)
- 76 H. Panusz, J. Bartkowiak, A. Krzywiec, M. Joustera und A. Plucienniczak, Nucleic Acids Res. 1, 1143 - 1151 (1974)
- 77 B. Polisky und B. McCarthy, Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2895 - 2899 (1975)
- 78 C. Crémisi, P.F. Pignatti und M. Yaniv, Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 548 - 554 (1976)
- 79 R. Axel, W. Melchior, Jr., B. Sollner-Webb und G. Felsenfeld, Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4101 - 4105 (1974)

- 80 A.J. Varshavsky und Yu.V. Ilyin, Biochem. Biophys. Acta 340, 207 - 217 (1974)
- 81 J.-E. Germond, M. Bellard, P. Oudet und P. Chambon, Nucleic Acids Res. 3, 3173 - 3192 (1976)
- 82 J.P. Baldwin, P.G. Boseley, E.M. Bradbury und K. Ibel, Nature 253, 245 - 249 (1975)
- 83 J.T. Finch und A. Klug, Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1897 - 1901 (1976)
- 84 G.I. Kiryanov, T.A. Manamshjan, V.Yu. Polyakov, D. Fais und Ju.S. Chentsov, FEBS Lett. 67, 323 - 327 (1976)
- 85 H. Slor und T. Lev, J. Biol. Chem. 247, 2926 - 2930 (1972)
- 86 R.E. Streeck, P. Philippsen und H.G. Zachau, Eur. J. Biochem. 45, 489 - 499 (1974)
- 87 R. Radloff, W. Bauer und J. Vinograd, Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 57, 1514 - 1521 (1967)
- 88 G.N. Godson und D. Vapnek, Biochem. Biophys. Acta 299, 516 - 520 (1973)
- 89 P.D. Sadowski, J. Biol. Chem. 246, 209 - 216 (1971)
- 90 J.A.V. Butler, P.F. Davison, D.W.F. James und K.V. Shooter, Biochem. Biophys. Acta 13, 224 - 232 (1954)
- 91 E.W. Johns, in: Histones and Nucleohistones (Hrsg. D.M.P. Phillips), 1 - 45 (Plenum, London und New York, 1971)
- 92 D. Oliver, K.R. Sommer, S. Panyim, S. Spiker und R. Chalkley, Biochem. J. 129, 349 - 353 (1972)
- 93 E.L. Böhm, W.N. Strickland, M. Strickland, B.H. Thwaites, D.R. van der Westhuizen und C. von Holt, FEBS Lett. 34, 217 - 221 (1973)
- 94 H. Busch, in: Methods in Enzymology, Band XII (Hrsg. H. Grossman), S. 68 (Academic Press, New York, 1968)
- 95 D.R. van der Westhuizen und C. von Holt, FEBS Lett. 14, 333 - 337 (1971)
- 96 G. Blobel und V.R. Potter, Science 154, 1662 - 1665 (1966)
- 97 H.H. Ohlenbusch, B.M. Olivera, D. Tuan und N. Davidson, J. Mol. Biol. 25, 299 - 315 (1967)
- 98 I. Bekhor, G.M. Kung und J. Bonner, J. Mol. Biol. 39, 351 - 364 (1964)
- 99 L. Kleiman und R.C.C. Huang, J. Mol. Biol. 64, 1 - 8 (1972)
- 100 W. Hörz und H.G. Zachau, FEBS Symp., Budapest 33, 403 - 408 (1975)

- 101 Worthington Enzyme Manual (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey, U.S.A., 1972)
- 102 M. Gross-Bellard, P. Oudet und P. Chambon, Eur. J. Biochem. 36, 32 - 38 (1973)
- 103 C. Aaij und P. Borst, Biochem. Biophys. Acta 269, 192 - 200 (1972)
- 104 A.C. Peacock und C.W. Dingman, Biochemistry 6, 1818 - 1827 (1967)
- 105 U.E. Loening, Biochem. J. 113, 131 - 138 (1969)
- 106 W. Pfeiffer, W. Hörz, T. Igo-Kemenes und H.G. Zachau, Nature 258, 450 - 452 (1975)
- 107 A.E. Dahlberg, C.W. Dingman und A.C. Peacock, J. Mol. Biol. 41, 139 - 147 (1969)
- 108 G. Fairbanks, T.L. Steck und D.F.H. Wallach, Biochemistry 10, 2606 - 2617 (1971)
- 109 S. Panyim und R. Chalkley, Arch. Biochem. Biophys. 130, 337 - 346 (1969)
- 110 H.G. Martinson und B. McCarthy, Biochemistry 14, 1073 - 1078 (1975)
- 111 K.S. McCarty, Jr., R.T. Vollmer und K.S. McCarty, Anal. Biochem. 61, 165 - 183 (1974)
- 112 H.O. Smith und D. Nathans, J. Mol. Biol. 81, 419 - 423 (1973)

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm und 1 cm Schicht- dicke
BS-C-1-Zellen	kultivierte Affennierenzellen (<i>Cerco- pithecus aethiops</i>)
Bsu	Restriktionsnuklease aus <i>Bazillus subtilis</i>
DNAase I, (II)	Desoxyribonuklease I, (II)
EcoRI	Restriktionsnuklease aus <i>Escherichia coli</i> mit dem Plasmid RI
EDTA	Äthylendiamintetraacetat, Na-Salz
Hae III	Restriktionsnuklease III aus <i>Hämophilus- aegyptius</i>
Hind II, (III)	Restriktionsnuklease II, (III) aus <i>Hämo- philus influenzae</i> Rd
Min.	Minuten
N	Nukleotide
Np	Nukleotidpaare
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunden
Std.	Stunden
SV 40	Simian-Virus 40
TEB	Tris-EDTA-Borat-Puffer
TEP	Tris-EDTA-Phosphat-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute

Die Abkürzungen für Nukleinsäuren folgen den Regeln der IUPAC-IUB-Kommission, Eur. J. Biochem. 15, 203 - 208 (1970); die Abkürzungen für Restriktionsnukleasen folgen den Vorschlägen in Ref. 112.

LEBENSIAUF

Am 4. Juli 1947 wurde ich als zweites von vier Kindern des selbständigen Kaufmanns Ludwig M. Steinmetz und seiner Ehefrau Annemarie, geb. Wiemann, in Lübeck geboren. Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Brockesvolkschule und anschließend das Carl-Jacob-Burckhardt-Gymnasium in Lübeck, wo ich im Herbst 1966 die Reifeprüfung bestand. Nach 15 Monaten Grundwehrdienst in Hamburg immatrikulierte ich mich zum Sommersemester 1968 an der Universität Hamburg für das Fach Chemie. Dort legte ich 1970 das Vor- und im Frühjahr 1973 das Hauptdiplom-Examen in Chemie ab. Die Diplomarbeit mit dem Thema "Bindung von gereinigter Pankreaslipase an Sepharose 2 B" wurde im Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Gercken angefertigt.

Seit April 1973 arbeite ich im Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau an meiner Doktorarbeit.

